

**Résumés des projets autorisés utilisant des animaux à des fins scientifiques
Deuxième semestre 2018 (1^{er} novembre 2018 au 31 décembre 2018)**

- 9657** Le caractère mâle ou femelle d'un bar est déterminé au cours du développement par le croisement d'influences génétiques et environnementales (en particulier la température lors de l'élevage larvaire), et est en cela très différent des chromosomes X et Y des mammifères. Aujourd'hui, dans les élevages de bar, les mâles prédominent largement (70-90%), ce qui est peu favorable à la production (les femelles grandissent plus vite et mûrissent plus tard) et à la mise en place de programmes de sélection (pour lesquels un nombre suffisant, si possible équilibré, de femelles est nécessaire). Le but de ce projet est de mieux comprendre les interactions de ces différents facteurs, en étudiant le sex-ratio, et le contrôle des gènes influençant le sexe chez de jeunes bars descendant de parents aux caractéristiques singulières :
"néomâles" = femelles génétiques inversées en mâles par la température ; mâles BT = conditionnés à basse température; mâles HT = conditionnés à haute température. Ceci sera fait à deux températures différentes, l'une masculinisante (HT) et l'autre sans impact sur le sex-ratio (BT)
La comparaison des sex-ratio des descendances de mâles BT et de néomâles permettra d'évaluer la possibilité d'utiliser ces néomâles pour augmenter le pourcentage de femelles dans les élevages. La comparaison des sex-ratio des descendances de mâles HT et BT permettra d'évaluer la possibilité d'une transmission transgénérationnelle d'effets environnementaux induits par la température au cours du développement larvaire de la génération précédente.
Nous espérons ainsi avoir des clés pour proposer des protocoles permettant d'augmenter et/ou contrôler la proportion de femelles dans les populations d'élevage, et également contribuer à l'amélioration des connaissances sur les mécanismes plus généraux de contrôle du sexe.
Réduction : Les nombres de poissons sexés en fin d'expérimentation sont réduits au minimum (150 descendants par mâle, soit 1200 au total) pour permettre une évaluation robuste des sex-ratio des descendances. Raffinement : toutes les manipulations (mesures, marquage) des poissons seront conduites sous anesthésie. Remplacement : nous confirmerons au cours de cette expérimentation une méthode de prédiction du sexe des animaux dont nous avons prouvé l'efficacité sur la génération parentale. La validation de cette méthode permettra par la suite, de travailler sur des individus dont le sexe le plus probable est connu au moment (très précoce) de l'orientation vers le sexe mâle ou femelle, sachant qu'un vrai marqueur génétique du sexe ne peut exister chez le bar du fait de l'absence de chromosomes X et Y et des effets environnementaux toujours possibles. Nous créerons d'ailleurs une banque d'échantillons (1200 individus échantillonnés à différents moments du développement larvaire) permettant de commencer le travail sur ces approches mécanistiques suite à la validation du modèle de prédiction - évitant ainsi la nécessité d'une expérimentation complémentaire à la suite de celle-ci. Au total, le projet utilisera 2400 animaux. Ce projet a pour objet d'étudier le déterminisme du sexe, qui est une interaction complexe entre la génétique de l'animal et son environnement. Les effets environnementaux adaptés (traitement thermique) doivent être appliqués à des phases de développement précises de l'animal. Il n'est pas envisageable de travailler sur des simulations ou des cultures cellulaires.
- 9658** Notre étude porte sur les cellules souches normales et cancéreuses intestinales afin de mieux comprendre les mécanismes conduisant à l'apparition du cancer colorectal et a fortiori la tumorigénèse en général. L'organisation générale, le développement et les mécanismes cellulaires de l'intestin et du côlon que nous étudions sont très similaires chez la souris et chez l'homme : le modèle murin est alors pertinent pour cette étude.

Un travail de recherche préliminaire sur ce projet a été effectué et approfondi sur modèle 3D (organotypique) in-vitro. En effet, sur des cultures d'organoïdes, des interactions directes entre les organoïdes intestinaux tumoraux (tumoroides) et les organoïdes intestinaux normaux ont été mises en évidence, suggérant un effet tumorigène collatéral induit par les tumeurs intestinales. L'étude de ces interactions hors de l'organisme présente cependant des limites et nécessite l'utilisation du modèle murin afin de valider et caractériser cette observation in-situ. Afin de caractériser ces interactions en situation réelle (où les cellules épithéliales, tumorales ou saines subissent également des interactions de l'environnement tissulaire) nous proposons d'effectuer des greffes dans l'intestin d'organoïdes tumoraux ou modifiés génétiquement, capables de transformer les organoïdes normaux in vitro afin d'observer leur impact sur l'épithélium colique de l'hôte.

Le remplacement réalisé par l'utilisation du modèle organoïdes a déjà permis une réduction drastique de l'utilisation de souris lors des expérimentations. Dans cette logique, les animaux utilisés dans le cadre de ce projet bénéficieront d'un raffinement expérimental accordant toutes les précautions liées à leurs bien être : la prise en charge de la douleur, du stress et une surveillance continue. Le nombre de souris requises pour ce projet (84) est ajusté au plus bas tout en restant compatible avec l'obtention de résultats statistiquement fiables. Les informations issues de ces expérimentations seront recueillies aux niveaux phénotypiques, cellulaires et moléculaires afin d'optimiser la collecte de résultats.

L'ensemble de ce projet contribuera à une meilleure compréhension du mécanisme tumoral et des connections entre cellules cancéreuses, cellules saines et microenvironnement.

9659 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 nous avons réussi à tirer des conclusions importantes de l'analyse de cytokines dans l'humeur aqueuse des patients. Pour remplacer des expériences chez l'animal, nous avons établis des modèles 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 travaux précédents, nous avons établi un modèle murin adapté à l'étude de l'impact de la toxoplasmose sur la rétine permettant aux souris infectées 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. Nous avons établi un modèle murin et l'avons développé durant les années précédentes. 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 la partie infections et l'hébergement. La partie IRM, effectuée dans un autre centre de recherche, est décrite par un projet séparé. Pour toutes ces expériences, les souris sont infectées par gavage, modélisant une infection naturelle. Après 4 semaines, les souris sont réinfectées localement, par injection intravitréenne de parasites, modélisant une réactivation rétinienne. En utilisant cette technique, nous augmentons considérablement le taux de rétines infectées et pouvons donc réduire le nombre de souris utilisées.

84 souris par expérience seront utilisées pour l'étude longitudinale par IRM de ce projet, réparties en 3 groupes de 28 souris selon différentes conditions expérimentales :

- un groupe de souris avec une première infection à J0, puis une réactivation oculaire de la toxoplasmose à J28
- un groupe contrôle avec une première infection à J0 seulement
- un groupe contrôle sans infection

Pour des raisons de variabilité entre différentes infections, cette expérience sera répétée 3 fois (n=3). A cela s'ajoutent encore 20 souris pour la mise au point des paramètres IRM. Le nombre de souris demandé est donc de 272.

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

- Réduire : L'utilisation de techniques non invasives comme l'IRM 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. En ce qui concerne les procédures mêmes, nous avons affiné les manipulations nécessaires pour garantir le bien-être des animaux dans la mesure du possible lors de nos précédentes études sur ce modèle. Pour le gavage, les utilisateurs bien expérimentés l'exécutent dans moins de 10 secondes sans souffrance pour l'animal. Pour l'infection intravitréenne, une anesthésie à l'isoflurane est appliquée pendant le temps nécessaire d'une minute maximale. L'injection intravitréenne est aussi bien maîtrisée et ne cause aucun dégât à l'œil. Pendant la période restant de la procédure, l'infection se passe inaperçu, selon notre expérience, à cause du faible inoculum choisi.

- 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.

9660 Les cellules- β des îlots pancréatiques sécrètent la seule hormone capable de diminuer les taux sanguins de sucres (glycémie) : l'insuline. L'hyperglycémie prolongée due à leur destruction/dysfonctionnement cause les diabètes sucrés. Mais traiter les cellules- β ne suffit pas : les cellules- α , également contenues dans les îlots pancréatiques (micro-organes pancréatiques), jouent aussi un rôle. L'hormone glucagon qu'elles sécrètent augmente la glycémie, ce qui aide à combattre les hypoglycémies. Cependant chez les diabétiques cette hormone est en excès comme chez les personnes âgées, participant ainsi à la dérégulation du contrôle glycémique observée chez les sujets diabétiques ou âgés en favorisant les hyperglycémies.

Sur un modèle génétiquement modifié de souris, nous avons déjà mis en évidence une meilleure gestion de la glycémie chez l'animal adulte que chez des souris contrôle du même âge. Les résultats déjà obtenus montrent que l'inactivation du gène étudié ralentit, voire abolit, le vieillissement du pancréas en termes de gestion de la glycémie sans en modifier la structure. Ce vieillissement est connu comme un facteur important contribuant chez l'homme à l'apparition du diabète de type 2, dont sont atteints environ 500 millions personnes dans le monde.

Les effets observés sont indépendants du foie, autre organe important dans la régulation du taux de glucose dans le sang. Il a été également montré qu'au niveau du pancréas, les profils expérimentaux étaient similaires entre souris génétiquement modifiées et contrôles. Le comportement des micro-organes pancréatiques suggère qu'ils ne présentent pas d'altération majeure. Le but de ce nouveau projet est donc de voir si d'autres régulateurs physiologiques (nerveux) entrent en jeu.

Pour ce projet, 2 groupes de 20 animaux maximum seront utilisés pour permettre un traitement statistique significatif des données obtenues en se laissant une marge de manœuvre en cas d'échecs. Ces 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 à la règle des 3R.

Ce projet sera réalisé en s'assurant qu'aucune angoisse, douleur ou souffrance inutile ne soit ressentie lors de toute intervention sur les animaux. Une observation quotidienne des animaux sera

effectuée pour s'assurer de leur bien-être. Une habitude des animaux avec le manipulateur sera faite dans la semaine précédant les expériences. En cas d'effet inattendu, les traitements appropriés seront mis en œuvre en accord avec les responsables du bien-être animal de notre établissement utilisateur.

Ces procédures ne peuvent être faites que sur l'animal entier car la régulation de la glycémie est liée à toute une série de réponses biologiques non reproductibles intégralement in-vitro.

Nous vérifierons dans un premier temps l'état métabolique des animaux par un test de tolérance au glucose. Nous vérifierons ensuite si l'effet observé chez nos souris génétiquement modifiées est dû à une modification du contrôle nerveux des micro-organes pancréatiques.

A la suite de cette procédure, les micro-organes seront isolés du pancréas des souris pour mesurer d'autres paramètres afin d'obtenir un maximum de données sur un minimum d'animaux utilisés.

9661 L'inflammation et la réaction immunitaire sont des réponses naturelles de notre corps à une agression. Lorsqu'elle est correctement contrôlée, elle permet la protection de l'organisme. Cependant dans un contexte pathologique, ces phénomènes doivent souvent être inhibés. Malheureusement, ces traitements ont des effets secondaires potentiellement sérieux qui sont propres à chacun. Le but de la recherche médicale est de mettre au point des traitements efficaces avec moins d'effets secondaires. La recherche est actuellement concentrée sur le développement de thérapeutiques dites « ciblées » c'est à dire qui vont interférer avec des fonctions précises de la réponse inflammatoire et immunitaire, fonctions qui sont impliquées dans la pathogénie de la maladie. Le modèle de poche d'air chez la souris permet d'étudier à la fois les réactions inflammatoires induites ainsi que les capacités potentielles de nouveaux médicaments à interférer spécifiquement avec les divers différentes voies cellulaires et humorales impliquées. Par exemple, l'injection de la carraghénane ou de LPS dans la poche est un moyen couramment utilisé pour induire une réponse inflammatoire et le recrutement leucocytaire.

Dans ce projet nous nous proposons d'utiliser ce modèle pour étudier les nouvelles molécules anti-inflammatoires et/ou immunosuppresseurs.

Dans le cadre du respect de la règle des 3R, réduction : chaque groupe expérimental du plan d'étude comporte 10 animaux afin d'obtenir un résultat statistiquement satisfaisant, remplacement : aucune méthode de remplacement n'est disponible pour étudier la problématique du présent projet. En effet, la réponse inflammatoire in vivo implique des interactions multiples et complexes. Bien qu'il soit possible de disséquer les événements inflammatoires individuels en détail avec des études in vitro, toutes les interactions impliquées dans la réponse inflammatoire in vivo sont pas possibles à simuler in vitro. Raffinement : le bien-être des animaux est primordial durant les expérimentations. Ainsi un certain nombre de mesure sont mise 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.

De plus nous cherchons toujours un compromis expérimental qui permet de réduire le nombre d'animaux utilisés.

Sur une période de 5 ans, l'utilisation de 600 souris est envisagée.

9662 Une souche de levure a été homologuée pour les chevaux par l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA). Pour le renouvellement de cette homologation, il est obligatoire de réaliser en conditions contrôlées trois tests d'efficacité in vivo dans l'espèce animale cible. Le présent projet vise à mener l'un de ces tests chez le cheval. Sera mesuré l'effet de la supplémentation en levure sur la digestibilité totale de la ration, l'écosystème microbien fécal et les acides gras à chaîne courte sanguins.

Les chevaux inclus dans l'étude sont douze hongres Trotteur Français adultes répartis en deux lots homogènes afin de tester la levure vs un placebo. Dans le schéma expérimental utilisé, chaque cheval est son propre témoin. En effet les chevaux du premier lot reçoivent le probiotique en première période expérimentale puis le placebo en deuxième période expérimentale. C'est l'inverse

pour les chevaux du deuxième lot. Ce dispositif permet d'utiliser un nombre minimal de chevaux tout en ayant la puissance statistique nécessaire pour répondre aux exigences des dossiers EFSA. En effet, les chevaux sont conduits en conditions contrôlées et uniformes afin de minimiser les variations liées à l'environnement.

L'étude durera neuf semaines ce qui est la durée minimale requise par l'EFSA. A la fin de chaque période expérimentale, la digestibilité de la ration est mesurée par récolte totale des fèces pendant quatre jours grâce à des harnais de digestibilité. Le port des harnais n'est pas douloureux pour les chevaux. De plus, les chevaux Trotteur Français ont été entraînés pour le trot attelé et ont donc l'habitude de porter des harnais. Un prélèvement de fèces est également effectué à heure précise le jour précédant la pose des harnais de digestibilité afin d'évaluer les modifications des paramètres de l'écosystème microbien fécal. Concomitamment un prélèvement sanguin est réalisé afin de mesurer l'absorption des acides gras à chaîne courte dans le sang. Cette analyse donne une indication complémentaire à l'évaluation de l'écosystème microbien fécal concernant l'absorption des nutriments issus de la digestion du cheval. Durant l'essai deux prélèvements sanguins et deux prélèvements de fèces sont donc réalisés par cheval.

A l'exception des deux fois quatre jours de mesure de la digestibilité, pendant les périodes expérimentales les chevaux vont au paddock en groupe et sont exercés par six au marcheur quotidiennement. Pendant la période de repos qui sépare les périodes expérimentales, les chevaux vont au pré en groupe. Ceci permet de respecter leur bien-être.

Au quotidien, le personnel animalier observe le comportement de chaque cheval le matin au moment de la distribution du repas afin de repérer les signes de mal-être ou de souffrance. Ces signes inhabituels sont immédiatement signalés au responsable de l'expérimentation.

Les chevaux qui présenteraient des signes de mal-être ou de souffrance seront soignés et si jugé nécessaire par le vétérinaire traitant retirés de l'essai.

9663 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'au personnel souhaitant maintenir ses compétences techniques, la possibilité de réaliser les techniques d'administration ou de prélèvements sanguins faits en routine dans nos animaleries.

Notre établissement développe depuis quelques années la transgénèse chez le rat. Ainsi, de nouveaux projets sont amenés à être réalisés chez cette espèce.

Cette formation permettra ainsi à nos techniciens d'être compétents et de réaliser l'ensemble des projets de l'institut dans les meilleures conditions pour les animaux. L'ensemble de nos projets se déroulant sur animaux vivants, il ne nous est pas possible de réaliser des formations autrement qu'avec des rats. Cependant, il existe des rats factices sur lesquels nous nous entraînerons aux différents prélèvements et administrations avant d'utiliser des animaux vivants.

Par ailleurs, afin de réduire au minimum le nombre de rats utilisées, dès que possible, les animaux servant aux formations proviendront d'autres projets terminés et de sévérité légère à modérée. Sachant que les animaux pourront faire un maximum de 3 procédures, un maximum de 344 animaux sera nécessaire pour assurer la formation continue et le maintien de compétences de l'ensemble du personnel concerné sur toute la durée du projet.

Aucun dommage particulier n'est attendu au cours de ces formations, les procédures étant classées légères. De plus, les animaux seront observés quotidiennement afin de s'assurer de leur bon état général et toute procédure potentiellement stressante sera réalisée sous anesthésie générale afin de préserver le bien-être animal.

9664 La technologie des ultrasons focalisés, désignée par l'acronyme HIFU (High Intensity Focused Ultrasound) permet d'effectuer l'ablation de tissus pathologiques de manière non invasive. Une sonde émet des ultrasons qui traversent la peau et se concentrent sur le tissu à traiter. Cette

concentration d'énergie provoque localement une élévation de température qui induit la destruction du tissu ciblé. Le geste est guidé par échographie ou IRM. Les HIFU sont déjà utilisés en routine pour traiter notamment les cancers de la prostate et les fibromes utérins.

Notre équipe développe un appareil HIFU marqué CE et utilisé en clinique dans plusieurs pays. Il est actuellement en phase d'essais cliniques aux Etats-Unis, pour le traitement des fibroadénomes du sein. L'autorisation pour conduire ces essais a notamment pu être obtenue en prouvant que le dispositif permettait de produire des lésions de taille maîtrisée et localisées précisément. La démonstration a été établie en exploitant les résultats de précédents travaux. De même, d'autres travaux réalisés ont permis de définir la procédure actuelle, 2 à 3 fois plus rapide que la précédente. Les avantages comparatifs du dispositif concernent aussi bien le patient (réduction de la durée de l'acte, absence de cicatrice, douleurs moindres...), les praticiens et les centres de traitement (augmentation du nombre de patients traités, sécurité, efficacité...) que la collectivité (économies). Le traitement des nodules thyroïdiens par HIFU se déroule à proximité de plusieurs structures sensibles telles que la carotide, l'œsophage, la trachée et le nerf récurrent. Des distances de sécurité vis-à-vis de ces structures sensibles doivent être respectées pour assurer leur intégrité. Actuellement, des marges de sécurité vis-à-vis de la carotide et de la trachée ont été définies et implémentées dans le logiciel de traitement. Des essais précliniques ont été conduits en aiguë (« Validation des limites de sécurité lors d'une thérapie par ultrasons (HIFU) - application à la thyroïde », avis favorable du ComEth suivi du ministère de la recherche en date du 30 avril 2015) afin de :

Affiner les limites de sécurité vis-à-vis de la carotide et de la trachée

Définir des distances de sécurité vis-à-vis de l'œsophage

Cette étude a démontré que les limites de sécurité implémentées assurent l'intégrité de la trachée et de la carotide, avec toutefois une atteinte à la périphérie carotidienne jugée mineure et transitoire par l'histopathologiste externe en charge de l'analyse. D'autre part, des dommages à l'œsophage, également décrits, comme résorbables ont parfois été observés. Selon l'histopathologiste en charge de l'étude, une à trois semaines suffiraient pour réparer ces dommages.

Objectif général. L'objectif général est de conduire des essais avec suivi distant afin de définir des distances de sécurité vis-à-vis des nerfs et d'étudier la réversibilité des dommages tissulaires observés sur l'œsophage et la microvasculature de la carotide.

Modèle animal et méthode : Le modèle choisi est la thyroïde de brebis. Ce modèle est pertinent pour atteindre l'un des objectifs de ce projet. En effet, elle est facilement accessible avec le dispositif de traitement HIFU et elle est située à proximité de l'œsophage et de la carotide.

Les brebis seront anesthésiées et on appliquera, par voie externe et sous contrôle échographique, l'énergie HIFU sur la thyroïde. Vis-à-vis de l'œsophage et de la carotide, on reproduira les dommages mineurs à modéré observés lors de l'étude antérieure. La sévérité des dommages engendrés peut être contrôlée de manière reproductible à l'aide du guidage par ultrasons. Etant données les observations histologiques (voir figures 1 et 2 en annexe), aucune atteinte fonctionnelle n'est attendue, ni aucune souffrance pour l'animal.

Pour réduire le nombre de brebis nous souhaitons délivrer deux traitements HIFU sur le même animal. Si les deux ne peuvent être délivrés sur le même lobe thyroïdien, le second sera délivré dans son voisinage immédiat. Les lésions HIFU créées dans ces tissus ne porteront pas atteinte à la survie de l'animal car ils sont suffisamment souples pour tolérer l'inflammation sans développer de syndrome des loges.

Dans ce souci de réduction du nombre d'animaux, nous définirons également les distances de sécurité vis-à-vis des nerfs sur ces mêmes brebis.

L'énergie HIFU sera délivrée à proximité des nerfs fibulaire et tibial. Leur intégrité sera ensuite mesurée par électromyographie (mesure du signal électrique transmis par les nerfs). Les distances de sécurité étudiées ont été évaluées par des simulations numériques afin de nous placer à des distances n'occasionnant pas de dommages sévères. Ces nerfs ont été choisis car ils sont situés à une profondeur compatible avec notre dispositif de traitement HIFU sur une partie de leur trajet. Ils comportent des fibres sensibles et des fibres motrices, ce qui permet d'étudier l'impact du traitement sur ces deux types de fibres.

Après traitement, les brebis seront réveillées pour que la régénération tissulaire de l'œsophage et de la carotide ait lieu et que les dommages aux nerfs atteignent leur niveau maximum. Les brebis seront maintenues en vie pendant une durée approximative d'une semaine ce qui coïncide avec la durée suggérée par l'histopathologiste pour observer la réversibilité des dommages à l'œsophage et à la carotide et permet l'observation des dommages maximums pour les nerfs. Ainsi, les deux phénomènes peuvent être étudiés sur les mêmes individus.

Dans une dernière phase, dix brebis seront consacrées au suivi de la régénération des nerfs. Les nerfs étant extrêmement sensibles à la chaleur, des dommages mineurs sont attendus. Les dommages observés seront reproduits sur ces individus qui seront maintenus en vie durant une période comprise entre 1 et 3 mois. La régénération sera étudiée via un examen fonctionnel ou par électromyographie.

Quarante-cinq brebis seront nécessaires à la réalisation de l'étude.

9665 Ce projet vise à étudier l'acclimatation différentielle à l'eau douce (ED) chez le loup *Dicentrarchus labrax*. Ce travail permettra d'obtenir des marqueurs au niveau de l'organisme, des cellules, des molécules et du comportement, indispensables à la meilleure compréhension de la variabilité des réponses chez cette espèce. La caractérisation des différents traits (du gène à l'organisme en passant par le comportement) devrait permettre de faire ressortir les variables clés qui sont affectées par une dessalure permettant de discriminer les individus tolérants à l'eau douce des intolérants. Ce travail préliminaire est indispensable pour, dans le futur, pouvoir aborder d'autres questionnements sur les aspects génétiques. De plus, cette étude vise à mieux comprendre la relation qui existe entre le comportement migratoire du *D. labrax* entre milieux de salinités différentes, la régulation de l'équilibre hydrominéral et le métabolisme. On peut supposer, soit que les loups sélectionnent leur habitat en fonction de leur capacité physiologique, ou alors qu'ils subissent au cours de leur migration des mortalités différentielles liées à la variabilité de la salinité des lagunes/estuaires. Nous allons donc nous intéresser aux questions suivantes :

- Quels sont les traits physiologiques clés qui permettent l'acclimatation des juvéniles de loups à une dessalure ?

- Quel est l'effet d'un changement de salinité sur le métabolisme des loups tolérants et intolérants et existe-t-il un compromis énergétique entre la respiration et l'osmorégulation ?

- Existe-t-il un lien entre le préférendum de salinité des loups et leur capacité à réguler leur équilibre hydrominéral ?

Ce projet consiste à classer un lot de 5400 juvéniles de loup (*Dicentrarchus labrax*) en fonction de leur capacité à tolérer une dessalure, permettant de distinguer les loups tolérants (estimés à environ 25%) versus les loups intolérants à l'eau douce. Suite à la dessalure, les loups seront soit échantillonnés, soit individuellement marqués en utilisant une puce électronique après un temps de récupération dans une salinité isotonique (correspondant à une salinité proche de celle du milieu intérieur, environ 12 ppt), puis maintenu en eau de mer dans un dispositif en common garden (loups tolérants et intolérants maintenus dans les mêmes bacs et identifiable grâce à leur puces électroniques). Après un séjour de 4 mois à cette salinité, des juvéniles de 7 mois (1350 individus tolérants et 1350 individus non tolérants à l'eau douce, sélectionnés au préalable) seront soumis à un deuxième challenge de dessalure et utilisés pour des analyses physiologiques, biochimiques, moléculaires, génétiques et comportementales à court (2 jours) et à long termes (2 semaines). 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 pour cette étude puisqu'elle porte sur une espèce méditerranéenne, dont l'élevage est bien maîtrisé par la plateforme expérimentale.

9666 Le choc septique est une conséquence grave des septicémies. La mortalité du choc septique est en moyenne de 50% mais peut atteindre 90% lorsque plusieurs organes ne fonctionnent plus ou mal (cerveau, rein, foie, cœur). Parmi l'ensemble de ces dysfonctionnements, une atteinte du

cerveau aggrave encore plus le pronostic vital qui est encore plus engagé. On peut observer une confusion (le patient ne sait plus où il est ni la date), une agitation (il se débat et crie), une somnolence voire un coma complet chez certains malades. Cette complication s'appelle l'encéphalopathie liée au sepsis. Quand on l'observe, la mortalité augmente de 25 à 63%; L'encéphalopathie liée au sepsis expose les survivants à un risque de survenue d'une démence 8 fois plus fréquent pendant les 10 premières années après la sortie de réanimation. C'est à dire que même guéri de l'infection initiale, on peut observer une démence, proche d'Alzheimer, apparaître jusque 10 ans après la sortie de réanimation. De plus dans 80% des cas des symptômes de la sphère anxio-dépressive sont observés chez l'homme (Anxiété, Dépression, Stress post-traumatique). Ces troubles sont très invalidants et pourraient expliquer le sur risque de suicide observé après un épisode de sepsis.

Les mécanismes de cette maladie impliquent différentes cellules du cerveau. Les cellules immunitaires, qui combattent les infections sont activées au cours des septicémies. Dans le cerveau il y a également des cellules immunitaires (cellules microgliales) dont la réaction en cas d'infection est toxique. Un autre type de cellule, l'astrocyte, est probablement impliquée dans le dysfonctionnement du cerveau. Les astrocytes soutiennent les neurones et leur donne l'énergie nécessaire à leur fonctionnement sous la forme de réseau assemblé par des molécules appelées connexines. L'astrocyte évite également une activité neuronale incontrôlée, et régule l'afflux de sang et le trafic de cellules immunitaires dans le système nerveux central. Ils organisent aussi la barrière séparant le sang (et les substances toxiques qu'il contient au cours des septicémies) du cerveau.

Le fonctionnement des neurones est alors altéré. Une grande activité d'un neurone conduit à son dysfonctionnement et à sa mort. C'est ce que l'on appelle l'excitotoxicité. L'étude et la modification de l'activité des neurones au cours du sepsis pourrait permettre de mieux comprendre les phénomènes survenant au cours du sepsis. Nous savons dans des modèles de culture cellulaire que l'inflammation peut avoir des conséquences néfastes sur les cellules du cerveau. Nous souhaiterions maintenant comprendre quelle est la conséquence de ces dommages cellulaires sur la mémoire qui n'est évaluable que chez l'animal. Pour l'instant les modèles de cerveaux in silico ne permettent pas d'évaluer les conséquences du sepsis.

Dans les septicémies, nous supposons que les fonctions des astrocytes et des neurones pourraient être perturbées et nous souhaitons étudier leur dysfonction par 6 procédures.

Ce projet a été élaboré dans le souci des règles de réduction du nombre d'animaux, du raffinement des conditions d'utilisation, et du remplacement de l'utilisation d'animaux par d'autres méthodes lorsque possible. Son déroulement est prévu sur une durée de 5 ans, au cours desquelles 1035 souris seront utilisées dans 5 procédures de sévérité modérée et 1 de niveau sévère. Le calcul du nombre d'animaux nécessaires a été effectué à l'aide de nos données préliminaires et d'analyses statistiques.

Nous avons recours à des règles d'élevage en accord avec la réglementation pour limiter la souffrance et le mal être des animaux. Les conditions de réchauffement, ainsi que la facilitation de l'hydratation et de l'alimentation par l'apport de gels nutritifs appétants, et l'utilisation d'antalgiques en présence de signes faisant suspecter une douleur sans atteinte des points limites font notamment partie des aspects permettant de limiter une souffrance inutile tout en rapprochant les conditions expérimentales des conditions de prise en charge d'un patient. De même tout acte invasif sera encadré par l'administration d'antalgique ou d'une anesthésie générale.

Les points limites que nous avons établis permettent de mettre fin à l'expérimentation pour les animaux en souffrance. Ces points limites reposent sur des signes cliniques dont l'état du pelage, l'activité spontanée et provoquée, l'aisance respiratoire ou encore la température corporelle et le poids,

Dans le souci de réduire le nombre d'animaux, les premières étapes de sélection de molécules seront réalisées en culture (aucun dommage n'est attendu par l'administration de ces molécules). Nous valoriserons au maximum chaque animal avec un partage des prélèvements par nos différentes équipes de recherche.

Le sepsis quant à lui provoque des modifications comportementales légères comme une baisse de la performance de la mémoire de travail, spatiale ou aversive de 20 à 40%, qui restent tout à fait compatible avec la vie. Nous avons développé un score permettant de réduire le temps de

souffrance animale à 12 heures maximum et moins dans la majeure partie des cas et éviter l'évolution vers la mort de l'animal par le sepsis induit.

9667 Le cancer de la prostate diagnostiqué à un stade invasif ou métastatique est une pathologie mortelle. Le traitement de référence implique les anti-androgènes (castration chimique), qui dans un premier temps fait régresser la tumeur. Néanmoins, dans un délai de 1 à 3 ans, tous les patients traités développent une récurrence tumorale très agressive qui entraîne systématiquement le décès du patient. L'identification des cellules tumorales résistantes aux traitements anti-androgéniques et capables de reformer une tumeur en absence d'androgènes est un enjeu majeur pour développer de nouveaux traitements plus efficaces contre cette pathologie.

Notre laboratoire vient d'identifier dans des tumeurs prostatiques de souris une population de cellules qui résistent à la castration. L'objectif de ce projet est de le démontrer par des expériences appropriées, dites "essai de transplantation", que ces cellules jouent un rôle essentiel dans la récurrence tumorale en absence d'androgènes. Cet essai consiste à greffer les cellules tumorales prostatiques (purifiées à partir de cancers prostatiques de souris "donneuses") sur le dos de souris hôtes, afin de voir si elles sont capables de reformer une nouvelle tumeur. Nous voulons également identifier les gènes qui contrôlent ces cellules en absence d'androgènes.

Pour atteindre notre objectif, l'utilisation de modèles animaux est incontournable car la croissance d'une tumeur dépend de multiples facteurs que l'on ne peut reproduire in vitro. Pour respecter le principe des 3R :

- nous utiliserons comme souris "donneuses" des souris dans lesquelles les cellules d'intérêt sont fortement enrichies, ce qui réduira le nombre de souris nécessaires. D'autre part, nous réaliserons deux greffes sur chaque souris hôte, ce qui divisera par deux le nombre de souris hôtes nécessaires. De plus, cette stratégie permet d'obtenir des résultats plus pertinents car nous combinerons sur la même souris une greffe des cellules d'intérêt et une greffe contrôle, ce qui prendra en compte la variabilité individuelle des animaux hôtes.

- Afin de limiter au maximum la souffrance et l'anxiété infligée aux souris, les greffes de tumeurs se dérouleront sous anesthésie générale et des antalgiques sont prévus. Les animaux seront particulièrement surveillés lors de ces procédures. Des points-limites ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire (notamment en fonction de la taille des tumeurs).

- Pour s'assurer du bien-être des souris, l'enrichissement est appliqué à chaque cage (coton et "maisons" en carton afin de les occuper et de construire un nid). Le suivi régulier des animaux permettra d'éviter les souffrances de l'animal liées à la croissance des tumeurs greffées.

Ce projet de 3 ans utilisera 125 animaux. Il devrait permettre de démontrer le rôle de cette population cellulaire dans la récurrence tumorale, et d'identifier les gènes qui les régulent, ce qui permettra ensuite de travailler sur le développement de nouvelles thérapies permettant de les éradiquer dans le contexte du cancer prostatique.

9668 La consommation de produits animaux contenant de la choline conduit à la formation par le microbiote intestinal de triméthyl amine (TMA). Une partie du TMA est absorbée au niveau du colon, rejoint la circulation sanguine et va être transformée par le foie en oxyde de triméthylamine (TMAO). Un taux circulant élevé de TMAO est associé à un accroissement du risque de développement de l'athérosclérose et donc du risque de développer des maladies cardiovasculaires, selon des mécanismes encore mal connus. Les maladies cardiovasculaires constituant la première cause de mortalité dans le monde et la deuxième en France, il est nécessaire de mettre en place des stratégies de prévention.

Le but de ce projet est de développer une formulation de complément alimentaire permettant de limiter la production de TMAO et de diminuer le développement de l'athérosclérose.

L'étude se déroulera en deux temps :

- 1) criblage de quatre formulations dans un modèle de souris nourries avec des régimes standards enrichis ou non en choline pour déterminer leur capacité à limiter la production de TMAO ;

- 2) validation de la capacité de la formulation la plus efficace à limiter le développement de l'athérosclérose dans le modèle génétique de développement de l'athérosclérose (souris invalidées pour le gène ApoE, ApoE^{-/-}).

La première partie sera menée sur une cohorte de 110 souris C57Bl6 et l'étude de validation comprendra 40 souris Apo E-/-.

A la fin du régime, les animaux seront euthanasiés sous anesthésie générale pour prélever le sang et doser le statut plasmatique en TMAO des animaux. Les tissus d'intérêt et le contenu caecal également collectés pour étudier l'impact de la supplémentation sur le microbiote et l'hôte.

Cette étude prendra en compte la règle des 3 Rs :

Remplacement : il n'existe à l'heure actuelle aucune méthode de substitution in vitro pour étudier l'impact de compléments alimentaires sur l'interaction microbiote/hôte et la prévention de l'athérosclérose. La souris est un modèle de choix car elle présente des mécanismes physiologiques proches de ceux qui sont observés chez l'être humain.

Réduction : le nombre d'animaux est le minimum nécessaire pour mettre en évidence des différences statistiquement significatives entre les groupes.

Raffinement : les méthodes utilisées sont en majorité non invasives. L'environnement sera enrichi par la présence d'un igloo en plastique et de nid végétal.

9669 Au-delà de leur rôle hémostatique bien décrit, les plaquettes sanguines sont impliquées dans de nombreux processus de défense immunitaire innée et acquise.

En effet, les plaquettes activées libèrent de nombreux médiateurs inflammatoires et immuns et interagissent avec les leucocytes, jouant un rôle majeur dans la défense antimicrobienne.

Le sepsis est défini comme une réponse inappropriée de l'hôte à une infection, se traduisant par un état de réponse inflammatoire systémique (SIRS), responsable de défaillances d'organes. Il représente un problème majeur de santé publique, à l'origine de plus de 30 000 décès par an en France.

Des études cliniques récentes permettent d'envisager le rôle bénéfique de médicaments antiplaquettaires dans le sepsis chez l'homme. Des travaux in vitro ont mis en évidence des mécanismes biochimiques qui régulent l'activation plaquettaire.

Notre objectif est de poursuivre ces travaux en étudiant l'effet de traitements pharmacologiques modulant l'activité plaquettaire sur la gravité du sepsis, pour lequel une application future chez l'homme pourrait être envisagée.

Pour ce faire, nous utiliserons un modèle murin de sepsis permettant d'induire un sepsis polymicrobien par péritonite (infection abdominale) se rapprochant au mieux d'un état de choc septique chez l'homme. Nous testerons ensuite l'effet de certains traitements pharmaceutiques sur l'évolution du sepsis.

Cette étude, prévue sur 5 ans, portera sur 723 souris.

Dans un souci de réduire au maximum le nombre d'animaux requis tout en permettant d'obtenir des résultats significatifs, les différentes procédures expérimentales ont été consciencieusement élaborées en suivant la règle des 3R et une approche statistique a été réalisée. Une surveillance attentive et un enrichissement des cages permettra d'assurer le bien-être des animaux. Afin de limiter au maximum la souffrance des animaux, les prélèvements seront réalisés par ponction intracardiaque sous anesthésie générale profonde. L'injection des traitements pharmacologiques s'effectuera sous anesthésie locale. Nous avons défini des critères cliniques d'interruption (points limites) au-delà desquels la souffrance et/ou la détresse d'un animal sera soulagée par le recours immédiat à l'euthanasie à tout moment de la procédure. Les animaux seront euthanasiés conformément aux exigences réglementaires en vigueur.

En caractérisant de nouvelles voies de signalisation plaquettaire intervenant dans la réponse inflammatoire systémique, ce projet permettra le développement de nouvelles stratégies innovantes de traitement des états septiques graves.

9670 Lors de la réplication, les virus à ARN génèrent des erreurs, des mutations. La réplication de l'ARN viral se fait avec des taux de mutation élevés ce qui crée un « nuage » de mutations, certains potentiellement bénéfiques, et qui permettent aux populations virales une plus grande probabilité d'évolution et d'adaptation à de nouveaux environnements ou défis lors de l'infection. 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 au sein de la population

virale. 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 se soit minutieusement ajustée pour assurer la survie évolutive du virus et qu'elle soit biologiquement déterminante pour le devenir de l'infection. Actuellement, nous travaillons sur le virus de chikungunya. Nous avons isolé des virus de diversité accrue ou réduite qui nous permettent d'étudier l'évolution du virus lors de l'infection de l'hôte (chez le moustique ou chez la souris). Nous allons utiliser ces variants à la fois comme outils pour suivre l'évolution naturelle du virus et pour déterminer leur potentiel en tant que candidats vaccinaux. En effet, le but de ce projet est de déterminer les bénéfices de l'utilisation de virus présentant une capacité évolutive compromise peut constituer une nouvelle stratégie vaccinale contre le virus de chikungunya, contre lequel des vaccins n'existent pas actuellement.

Le recours à l'animal est nécessaire car l'évolution virale en culture cellulaire ne reproduit pas totalement ce qu'il se passe au sein d'un hôte infecté et la confirmation d'atténuation virale nécessite un modèle animal. En revanche, les 3 R sont bien pris en compte. En ce qui concerne le remplacement des animaux, jusqu'à 20 candidats vaccinaux seront caractérisés d'abord en culture cellulaire pour sélectionner les souches qui présentent les profils les plus prometteurs (avec une diversité génétique accrue ou réduite au maximum par rapport à la souche sauvage). Cet exercice nous permet de réduire le nombre de souches à caractériser chez l'animal à 4 souches. Ces expériences seront réalisées chez les souris C57BL/6 ou Balb/c âgés de 3 ou 4 jours, qui sont hébergées en isolateur (mère + portée). Un maximum de 360 souris sera nécessaire sur une durée de 5 ans. Nos précédentes études et analyses statistiques nous permettent également de réduire le nombre de souris à 1 cage (mère + portée) pour chaque lot de virus (virus sauvage ou virus portant un taux de mutation modifié) avec 1 temps d'analyse (4 jours post-infection). En tout, 1 procédure expérimentale sera réalisée, qui sera répétée un maximum de trois fois et dont le degré de sévérité est modéré. La douleur subie au moment de la manipulation sera de très courte durée car nos expériences sont constituées d'infection par injections sous-cutanées rapides. Une seule injection sera réalisée, et la souris sera toute de suite remise en cage avec sa mère et la portée. L'enrichissement de l'environnement pour le bien-être des animaux dans leur hébergement sera rassuré par l'utilisation de maisonnettes en carton et des fibres en coton (Carfil Cotton ou Carfil Nestlets). Les souris seront suivies quotidiennement. 4 jours après l'infection, les souris seront mises à mort et différents tissus seront récupérés, homogénéisés et les virus ainsi libérés seront quantifiés. Nous utilisons un modèle murin bien caractérisé. Il n'est pas nécessaire d'attendre que l'infection devienne sévère (début de paralysie entre le 5ème et 7ème), car la charge virale maximale est atteinte entre 3 et 4 jours après infection, et suffira pour déterminer si un variant de chikungunya est atténué par rapport au virus sauvage.

9671 La dépression, la schizophrénie, les troubles obsessionnels compulsifs (TOC) ou encore troubles anxieux généralisés constituent des pathologies neuropsychiatriques dont la prise en charge reste difficile. Ces troubles résulteraient en partie de perturbations de la transmission dopaminergique conduisant à un dysfonctionnement des circuits neuronaux qu'elle contrôle.

Dans ce projet nous nous proposons d'identifier les neurones cibles de la dopamine (c'est à dire exprimant les récepteurs dopaminergiques) dans le cervelet et de préciser le rôle fonctionnel de ces récepteurs et de ces neurones dans des comportements associés à des tâches motrices et à l'humeur.

La réalisation de ce projet nécessite l'utilisation de différentes lignées de souris transgéniques permettant 1) l'identification des neurones exprimant les récepteurs dopaminergiques de type D2 et de 2) déterminer le rôle fonctionnel des récepteurs D2R exprimés dans le cervelet.

Le nombre total d'animaux prévu pour cette étude est de 420 sur une période de 3 ans. Ce nombre a été déterminé de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en gardant suffisamment pour ne pas compromettre la validité des expériences qui seront menées. Ce projet implique de la neurochirurgie qui sera effectuée sous anesthésie générale avec une prise en charge antalgique adéquate. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et

évalué grâce à une grille codifiant le niveau de bien-être. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée si des signes de souffrance sont détectés.

Le projet traitant de troubles neuropsychiatriques et nécessitant des approches comportementales, il nous est impossible de remplacer l'animal vivant par des méthodes alternatives.

9672 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 (enzymes qui clivent 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 serpines semble être une approche thérapeutique à exploiter. Une étude préliminaire conduite sur un modèle de colite aiguë a permis de mettre en évidence un effet anti inflammatoire de plusieurs serpines.

Le but du projet est de déterminer l'effet des serpines sur l'équilibre du microbiote intestinal de malades humains transplanté chez des souris et d'étudier leurs effets protecteurs dans le cadre d'une inflammation intestinale de faible niveau. Ces serpines sont sélectionnées sur la base de résultats in vitro (activité d'inhibition) et in vivo (projet précédant mettant en jeu un modèle souris 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 induite par le Dextran Sulfate de Sodium (DSS) chez la souris reproduit un grand nombre des caractéristiques physiopathologiques des maladies inflammatoires chroniques 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 l'utilisation fréquente de ce modèle dans les études sur ces maladies et en particulier dans notre projet.

Au cours de ce projet, un microbiote de sujet humain atteint de maladie inflammatoire chronique de l'intestin sera inoculé à des souris axéniques (souris sans microbiote intestinal, élevées dans des bulles stériles). Une fois le microbiote du malade installé dans le tractus digestif des souris, l'administration quotidienne pendant 3 semaines d'une des 3 serpines s'étant révélée efficace dans l'étude précédemment réalisée, permettra de vérifier que ces molécules ne modifient pas l'équilibre du microbiote intestinal du malade. Cette procédure sera répétée avec différents microbiote de malades. En parallèle, la colite sera induite grâce à l'administration du DSS à faible concentration (1%) pendant ces 3 semaines. 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.

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 : Il n'existe pas à l'heure actuelle de modèle, autre que les modèles animaux, simulant une inflammation intestinale. Le recours au modèle animal est nécessaire pour tester l'efficacité des serpines sur cette pathologie. L'étude de l'effet des serpines sur le microbiote intestinal de malades humains doit être effectuée avant d'envisager un développement de ces molécules comme agents thérapeutiques. Cette étude doit être faite chez l'animal avant de la conduire chez l'Homme.

Réduire : Le nombre de souris nécessaire 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 cette étude, 4 séries permettant d'étudier l'effet des 3 meilleures serpines sur

l'équilibre du microbiote de 4 patients malades seront mises en œuvre. Chaque série comprendra 6 groupes de 8 souris (3 groupes recevant les serpins d'intérêt, 3 groupes témoins ne les recevant pas). Le nombre total d'animaux pour ce projet est alors de 192 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 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. 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.

9673 La carie dentaire, une fois la cavité formée, ne se guérit jamais spontanément. Consulter un dentiste est donc incontournable. Lors de la consultation, celui-ci choisit le traitement approprié en fonction du stade de développement de la carie. Plus la carie est ancienne, plus votre dent est attaquée, plus l'intervention du dentiste sera importante. Lorsque la carie n'est pas très avancée, l'objectif du soin est de préserver la pulpe et de garder la dent vivante un simple pansement suffira. Lorsque la carie est trop profonde la pulpe dentaire est atteinte, il faut pour empêcher la douleur (et la rage de dents inévitable) procéder à la dévitalisation de la dent malade. La première étape consiste en l'élimination du tissu pulpaire puis en la désinfection de la zone. En effet la carie peut avoir contaminé la pulpe et même entraîner une nécrose partielle ou complète des canaux : c'est ce qui entraîne la classique rage de dents. Une fois nettoyée et vidée, il faudra mettre en forme les canaux des racines pour les préparer à être obstrués. Cette opération peut être guidée à l'aide de clichés radio pour les racines les plus sinueuses. Une fois les canaux parfaitement prêts, ils sont alors bouchés. Enfin, le dentiste reconstruira la forme de la dent afin de la rendre à son usage naturel. D'une façon générale, il est rare qu'on laisse une dent dévitalisée en l'état car elle est alors beaucoup plus fragile. Lors du nettoyage du tissu lésé sur une carie profonde, il n'est pas rare d'exposer cette pulpe. Jusqu'à il y a quelques années cette seule exposition suffisait pour justifier une dévitalisation systématique. Le développement de matériaux bioactifs a permis de reconsidérer les thérapies pulpaires en induisant une minéralisation contrôlée à son contact, créant ainsi une barrière étanche à l'attaque bactérienne. A partir des tests in-vitro, deux nouveaux biomatériaux MTA (Minéral Trioxyde Aggregate) enrichis ont été sélectionnés pour leur efficacité. L'objectif de cette étude est d'évaluer les effets anti-inflammatoires du produit sur la pulpe à court terme, et de la conservation de ses propriétés biologiques initiales à moyen terme (5 semaines). Le modèle choisi est le mini-porc gottingen adulte qui a l'avantage de ne pas dépasser les 45 kg.

Dans un premier temps, il y aura induction d'une inflammation réversible, chronique et modérée de la pulpe sur les molaires des animaux en reproduisant un protocole expérimental validé et utilisé couramment chez le rat et le chien par simulation d'une cavité carieuse.

Puis, 96h après l'induction de cette inflammation, les dents seront traitées exactement comme en clinique, sous champ opératoire, avec mise en place des matériaux préalablement sélectionnés lors de la phase in vitro

Ensuite, les animaux seront mis à mort après 48h, 96 h ou 5 semaines (3 groupes de 3 animaux soit un total de 9 mini-porcs Gottingen). L'effet des matériaux sera évalué en Histologie.

Dans le cadre de la règle des 3Rs

Réduire : les études in-vitro ont permis de sélectionner deux biomatériaux sur 5 pour leur efficacité, le nombre d'animaux pour chaque groupe sera de 3 et l'ensemble des molaires de chaque animal sera utilisé. 4 molaires pour chaque biomatériau et 2 pour les contrôles. Ainsi 3 groupes de 3 animaux seront suffisant pour évaluer de façon statistiquement fiable l'effet anti inflammatoire à court terme et reconstituer à moyen terme.

Remplacer : Après de nombreuses évaluations in-vitro de l'efficacité des 2 biomatériaux, il était indispensable de passer par un modèle animale, le porc ayant une alimentation omnivore, sa dentition est assez similaire à l'humain.

Raffiner : les miniporcs seront hébergés sur caillebotis PVC en groupe sociaux durant toute la durée des procédures, le milieu sera enrichi de jouer dédié type balles à bruit et disques à mordre.

L'ensemble des procédures sera effectué sous anesthésie générale isofluran 2.5% 30% oxygène 70% protoxyde d'azote avec analgésie morphinique. Les douleurs post opératoire seront traitées par 30mg de Morphine (15mg matin et 15 mg soir) durant 72h puis par du paracétamol 30mg/kg/jour pendant 7 jours. La mise à mort sera obtenue par surdose de d'anesthésie (doléthol) et validée par un ECG plat.

9674 Le larynx appartient au carrefour aéro-digestif et assure une triple fonction de déglutition, respiration, phonation. Chaque année en France 1800 laryngectomies totales sont pratiquées. Le patient laryngectomisé peut alors présenter une altération de sa relation aux autres et un isolement social. La plupart des travaux de recherche sont axés sur la réhabilitation vocale, mais très peu s'intéressent aux conséquences d'une trachéostomie définitive.

La conception d'une prothèse laryngée implantable remplaçant les fonctions du larynx est l'objet de ce projet. Elle associe une structure rigide inamovible et une structure amovible biofonctionnelle recréant le sphincter laryngé. Des études préliminaires ont permis la réalisation d'un larynx artificiel en titane implanté chez 6 patients. Cinq patients ont présenté une extrusion de la prothèse ou une intolérance conduisant à son explantation. Un patient tolère sa prothèse depuis son implantation il y a deux ans. Cependant, des améliorations concernant la phonation et la déglutition sont encore à apporter.

L'objectif de l'étude est d'évaluer la possibilité d'utiliser une allogreffe d'aorte cryoconservée provenant d'un bélier dans le cadre d'une réhabilitation laryngée chez la brebis.

L'utilisation d'un modèle expérimentale animale est indispensable pour la réalisation de ce projet.

La brebis possède un larynx ayant une anatomie et des dimensions similaires au larynx humain, ce qui en fait donc un modèle idéal. Un groupe de 8 animaux est suffisant pour nos études statistiques. L'analyse de plusieurs paramètres (anatomiques, histologiques et génétiques) sur un même prélèvement rend possible ce nombre restreint d'animaux.

L'intervention sera réalisée sous anesthésie générale avec monitoring de l'analgésie pré, per et post-opératoire. Un score de la douleur sera établi, basé sur le comportement des animaux, et selon le résultat une analgésie sera mise en place ou la mise à mort sera anticipée si nécessaire.

Les greffons seront prélevés au cours d'une procédure entièrement menée sous anesthésie générale et analgésie, suivie de la mise à mort des animaux sans réveil.

Cette étude permettra d'évaluer la possibilité d'utilisation d'une allogreffe aortique dans le cadre du remplacement laryngé. Un autre intérêt de l'utilisation d'allogreffes cryoconservées est la grande accessibilité de ces greffons au sein de banques certifiées.

9675 La microcirculation est la composante du système circulatoire qui correspond aux plus petits vaisseaux sanguins, situés au sein des organes; elle est composée des artérioles terminales, de capillaires et de veinules. La microcirculation est un système complexe et essentiel au bon fonctionnement des organes, puisqu'elle permet l'apport d'oxygène et de métabolites aux cellules parenchymateuses, elle contraste avec la macrocirculation qui est responsable de l'apport sanguin vers et depuis les organes.

La microcirculation joue un rôle clé dans la survenue de défaillance d'organes chez le patient gravement malade, des altérations de cette composante entraîne un déséquilibre entre l'apport d'oxygène et la demande en oxygène des tissus, favorisant la survenue d'un état de choc.

Jusqu'alors, la réanimation du patient critique passait par le rétablissement des paramètres macrocirculatoires (tels la fréquence cardiaque, la pression artérielle et le débit cardiaque), mais cette approche apparaît insuffisante pour garantir la survie du malade. Plusieurs études ont montré que la mortalité des patients en soins intensifs pouvait rester élevée en dépit de la restauration des paramètres macrocirculatoires et que des désordres microcirculatoires pouvaient persister malgré la normalisation macrocirculatoire, associés à un mauvais pronostic. Ces altérations microcirculatoires apparaissent fréquentes dans certaines affections graves comme le sepsis (qui correspond à la survenue de dysfonctions d'organes secondaire à une réponse inappropriée de l'hôte à une infection), mais elles sont aussi décrites dans d'autres conditions pathologiques graves comme l'insuffisance cardiaque, les états de chocs de diverses origines et la phase post-opératoire de chirurgies majeures.

Les progrès technologiques récents ont autorisé une évaluation plus précise de la microcirculation. Ceci a conduit à une nouvelle approche en matière de réanimation, basée non seulement sur les paramètres macrocirculatoires, mais aussi microcirculatoires. Pour autant, les méthodes actuelles d'évaluation de la microcirculation ne permettent pas un monitoring continu et en temps réel de ce paramètre et restent limitées à certaines zones du corps. Récemment, un nouveau dispositif utilisant la photopléthysmographie a été validé dans un modèle expérimental de choc septique, consistant en une sonde de nutrition entérale équipée d'un capteur photopléthysmographique et destinée à être positionnée dans l'intestin grêle (duodénum), territoire réputé sensible lors d'état de choc. Ce nouveau dispositif permet une évaluation continue et en temps réel de la perfusion intestinale mais doit être positionné sous guidage endoscopique, ce qui représente une contrainte importante dans son utilisation, d'autres sites de mesures associés à un positionnement plus faciles seraient ainsi pertinents.

Ce projet se propose d'évaluer la fiabilité et la qualité du signal donné par le dispositif photopléthysmographique appliqué sur des sites différents de celui d'origine, en particulier la muqueuse œsophagienne et urétérale. Les données recueillies seront comparées avec le site duodéal et avec une méthode de référence, la vidéo microscopie. Les autres objectifs sont les suivants : comprendre l'influence respective de divers facteurs sur la qualité du signal (notamment l'influence de la volémie, du tonus vasculaire local, de la concentration sanguine en hémoglobine et de la teneur en oxygène du sang), évaluer les modifications de perfusion tissulaire en fonction de l'origine du choc.

Ce projet, dont la durée est évaluée à 5 ans, repose sur l'utilisation de modèles porcins anesthésiés, qui permettent de reproduire des conditions pathologiques similaires à l'homme, et dont le gabarit permet l'utilisation de dispositifs médicaux adaptés à l'usage humain, en particulier pour la surveillance des paramètres macro et microcirculatoires. Il n'existe à ce jour aucun modèle alternatif permettant d'évaluer la microcirculation, en particulier dans des contextes pathologiques. Un maximum de 150 cochons est envisagé sur 5 ans, le nombre d'animaux pour chaque partie du projet étant restreint au nombre minimum permettant la réalisation de test statistique afin de pouvoir interpréter les résultats.

9676 Le cancer de l'œsophage est une pathologie fréquente et grave. Il représente la 6ème cause de décès par cancer dans le monde.

Les traitements endoscopiques ayant pour but de réséquer les tumeurs superficielles de l'œsophage sont une excellente alternative à la chirurgie. Grâce au passage par la voie naturelle digestive supérieure, ils ont en comparaison avec la chirurgie, une morbidité et une mortalité bien moins importantes. La technique endoscopique actuelle de référence, appelée dissection sous-muqueuse (DSM), présente de très bons résultats concernant l'ablation de la tumeur superficielle. Malheureusement, elle se complique fréquemment lors de la cicatrisation, d'une diminution de diamètre de l'œsophage, appelée sténose cicatricielle.

Le but de ce projet est de développer un traitement préventif de la formation de ces sténoses œsophagiennes. Pour ce faire nous testerons un nouveau gel ayant des propriétés cicatrisantes que nous déposerons sur la cicatrice de DSM. Dans un des groupes, on associera au gel des vésicules extracellulaires de cellules souches mésenchymateuses (CSM) qui possèdent des facteurs de croissance et des facteurs anti-inflammatoires.

Le porc charcutier, par ses similitudes anatomiques et histologiques avec l'Homme est un excellent modèle expérimental de sténoses œsophagiennes. La taille et les mensurations de l'animal permettent l'utilisation du matériel et des techniques endoscopiques employés chez l'Homme. Ce modèle est reconnu et validé dans la littérature scientifique. Son utilisation est nécessaire car seule l'expérimentation in vivo, mimant le plus fidèlement possible l'environnement tissulaire après DSM permettra de répondre à la question de la formation ou non de la sténose œsophagienne. Les vésicules extracellulaires de CSM, en tant que nouvelle thérapie cellulaire, doivent également être testées in vivo avant leur application chez l'Homme.

Ce projet est développé dans le respect de la règle des 3R. 18 porcs seront utilisés, ce nombre minimum est suffisant pour permettre une analyse statistique fiable et robuste. Les animaux seront soumis à une dissection sous-muqueuse étendue par endoscopie, mais sans induction de tumeur.

Pour éviter toute souffrance, les animaux seront prémédiqués par un sédatif et un antalgique de type morphinique puis l'intervention aura lieu sous anesthésie générale, maintenue après intubation par anesthésie gazeuse. Tout au long de la procédure les animaux seront disposés sur un tapis chauffant permettant de maintenir la température corporelle à 37°C. On appliquera sur la cicatrice le gel seul, ou associé aux vésicules extracellulaires, afin d'être comparé à la DSM sans traitement complémentaire. Des antalgiques seront prévus en post-opératoire incluant 48h d'antalgique morphinique et cinq jours d'anti-inflammatoire. On administrera des anti-acides durant les 3 semaines de suivis et des antibiotiques pendant 5 jours. La reprise de l'alimentation se fera comme suit : eau sucrée J1, alimentation liquide J2, alimentation solide J3.

Les animaux seront hébergés dans une salle chauffée et/ou climatisée à 24°, ils seront deux par case avec alimentation à et eau à volonté.

Les animaux seront ensuite suivis cliniquement pendant 3 semaines quotidiennement en association avec notre équipe vétérinaire. Nous évaluerons le comportement, l'alimentation, l'hydratation, les signes de souffrance. Une grille précise d'évaluation des points limites sera définie et des antalgiques adaptés à ces points limites seront utilisés. Une analyse radiologique et endoscopique sera réalisée à J21, également sous anesthésie générale et antalgiques, afin d'évaluer la sténose œsophagienne.

Les résultats de ce projet permettront de mettre en place un traitement préventif des sténoses œsophagiennes chez l'Homme, effet secondaire invalidant de la DSM ; cette technique innovante étant moins risquée et moins invasive que la chirurgie pour la prise en charge des tumeurs superficielles de l'œsophage.

9677 La parole est une tâche sensori-motrice acquise, extrêmement complexe, et l'apprentissage vocal, qui conduit à la maîtrise de la parole, est probablement l'une des manifestations les plus frappantes des capacités cognitives du cerveau humain.

Afin d'étudier les mécanismes neuronaux de l'apprentissage vocal, et plus largement de l'apprentissage sensori-moteur, nous avons choisi un modèle animal particulièrement adapté : l'oiseau chanteur. Les oiseaux, comme les humains, apprennent très jeunes leurs vocalisations complexes par imitation d'un ou plusieurs adultes, au cours d'un processus d'apprentissage par essais et erreurs. A l'instar des humains, une phase d'apprentissage perceptuel (écoute) guide la production, plus tardive, des vocalisations et la capacité d'apprentissage baisse considérablement avec l'âge. Du fait des nombreuses similarités dans le processus d'apprentissage, et de l'homologie des circuits neuronaux impliqués, il est hautement probable que des mécanismes neuronaux communs soient utilisés chez l'homme et l'oiseau.

L'apprentissage de la parole fait intervenir des régions du cerveau également impliqué dans l'apprentissage sensorimoteur chez l'homme, et en particulier celui de la parole : le cervelet et les ganglions de la base. Je propose d'étudier chez l'oiseau chanteur les mécanismes mis en jeu dans ces régions du cerveau au cours de l'apprentissage sensori-moteur en général, et vocal en particulier. Ce projet permettra de révéler les mécanismes microscopiques (de la cellule au réseau) relatifs à l'apprentissage vocal, qui repose très probablement sur des mécanismes similaires chez l'homme et l'oiseau. Mon étude de ces mécanismes chez l'oiseau contribuera à clarifier les bases neurobiologiques du langage.

Afin d'étudier expérimentalement les mécanismes de l'apprentissage sensorimoteur, nous étudierons le rôle de ces structures cérébrales dans la production, l'apprentissage et la plasticité du chant essentiellement chez le diamant mandarin (*Taeniopygia guttata*), modèle par excellence pour aborder les mécanismes neurobiologiques de l'apprentissage de la parole et est très utilisé dans de très nombreux laboratoires dans le monde. Pour certaines questions spécifiques, cependant, nous utiliserons deux autres espèces, également utilisées dans de nombreux laboratoires dans le monde : le canari (*serinus canaria*), et le moineau du japon (*Lonchura striata domestica*). Le canari présente deux avantages : d'une part une plasticité saisonnière, qui sera utilisé comme paradigme de plasticité du chant chez l'adulte, d'autre part une séquence chantée complexe impliquant des transitions stochastiques entre syllabes. Le moineau du japon est, lui, un cousin proche du mandarin présentant une séquence chantée légèrement plus complexe. Dans ces deux espèces, les

mécanismes de générations de séquences motrices complexes peuvent être interrogés, ce qui n'est pas le cas pour le diamant mandarin, dont le chant unique présente une séquence linéaire.

Nous enregistrerons l'activité neuronale dans les régions concernées du cerveau chez l'oiseau anesthésié ainsi que pendant la production du chant. D'autre part, nous conduirons des lésions dans différentes parties du réseau chez l'oiseau pendant et après apprentissage du chant et quantifieront leur effet sur la production et l'apprentissage du chant grâce à des analyses quantitatives des vocalisations produites. Enfin, la manipulation de l'activité neuronale à l'aide d'outils optogénétique sera combinée à ces dernières approches afin d'induire artificiellement un apprentissage rapide et réversible chez l'oiseau adulte. Sur la période de 5 ans couverte par le présent protocole, nous prévoyons d'utiliser environ 300 diamants mandarins, 80 canaris et 20 moineaux du Japon pour la réalisation de ce projet scientifique. Le faible nombre de moineaux du Japon utilisé est dû à leur utilisation dans une unique procédure qui consiste à faire des lésions partielles cérébelleuses (10 oiseaux lésés et 10 oiseaux contrôles seront suffisants).

Le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum, et ce à l'aide d'une approche statistique a priori nous permettant de déterminer le nombre de sujet nécessaire pour tester nos hypothèses. Les méthodes expérimentales sont constamment révisées pour limiter au maximum les douleurs ou atteintes faites aux animaux. L'administration systématique de traitement de la douleur en amont des procédures permet notamment d'éviter toute douleur intense, et les conditions d'hébergement et d'expérimentation sont pensées pour se rapprocher au maximum de l'environnement naturel de l'oiseau. Enfin, une approche théorique (non décrite ici), complémentaire de l'approche expérimentale décrite ici, permet de remplacer certaines expériences par une exploration computationnelle des circuits neuronaux étudiés.

9678 La tuberculose humaine demeure un enjeu majeur de santé publique. Encore de nos jours, des millions d'humains sont touchés par cette maladie. Au sein de notre unité de recherche, nous nous intéressons à l'identification et à la compréhension des mécanismes génétiques et moléculaires caractérisant la bactérie parasite responsable de cette maladie : *Mycobacterium tuberculosis*. Ces informations peuvent s'avérer très importantes pour le développement de nouveaux outils préventifs, diagnostiques et thérapeutiques afin de combattre la tuberculose. Pour cette recherche, l'expérimentation animale via des infections par aérosol et/ou injections intraveineuses reste indispensable pour étudier l'effet du pathogène sur un organisme entier. La souris constitue un modèle largement accepté pour la recherche sur les mycobactéries pathogènes et demeure un modèle pertinent, notamment dans l'étude de la réponse immunitaire à l'infection. Le modèle souris continue de jouer un rôle essentiel dans le criblage et la sélection de souches, molécules, vaccins avant leurs essais sur des modèles plus grands.

L'objectif de notre projet consiste à étudier les facteurs de virulence de *M. tuberculosis*, notamment l'importance de leur fonction, au cours d'une infection et ce, pour déterminer leur potentiel comme cibles vaccinales ou thérapeutiques. Au cours de ces travaux, si, pour l'un de ces gènes, il est mis en évidence un rôle essentiel dans la pathogénicité de *M. tuberculosis*, une stratégie ciblée sur ce gène sera mise en place avec pour perspective le développement de moyen pour perturber le bon fonctionnement qui aurait une conséquence directe sur l'activité de la bactérie et un impact certain sur l'évolution de la maladie.

Au sein de notre laboratoire, nous caractérisons des protéines de *M. tuberculosis* et tentons d'élucider leur rôle dans la virulence, nous modifions en fonction des bacilles tuberculeux pour mieux comprendre leur fonction et ainsi confirmer (ou non) leur implication en comparant la virulence de souche modifiée avec celle de la souche sauvage dans un premier temps in vitro via des infections de cellules. Nous souhaitons vérifier, dans un second temps, in vivo la pertinence des résultats les plus convaincants.

Succinctement, une expérience d'étude de virulence repose sur deux grandes étapes : 1) l'infection par aérosol (sur animaux immunocompétents) ou par voie intraveineuse (sur animaux immunodéprimés) puis 2) la mise à mort des animaux entre 3 et 6 semaines post-infection avec prélèvement des poumons et de la rate pour dénombrer le nombre d'unités formant colonies (UFC). Ces dénombrements et leur comparaison entre les différentes souches testées permettront de statuer sur la virulence des souches et de confirmer ou non le rôle des protéines étudiées.

Parallèlement, nos travaux s'intéressent également à la recherche d'un nouveau vaccin présentant une meilleure efficacité que le BCG. Avec cet objectif, nous modifions l'expression de facteurs de virulence afin d'obtenir des souches atténuées qui sont utilisées pour immuniser des animaux et dont l'effet protecteur est ensuite estimé en exposant les animaux à la souche virulente de référence *M. tuberculosis* H37Rv.

Les étapes expérimentales sont succinctement : 1) l'immunisation des animaux immunocompétents avec des souches tuberculeuses atténuées, 2) l'infection par aérosol 4 semaines après immunisation et enfin 3) la mise à mort des animaux à 4 semaines post-infection. Le dénombrement et la comparaison des UFC au sein des organes des animaux permettront de statuer sur l'effet protecteur des différentes souches utilisées lors de l'immunisation.

Au cours des 5 ans à venir et en se basant sur nos précédents travaux, une douzaine d'expériences d'étude de virulence en duplicat et 5 expériences de protection en duplicat pourraient être menées. Il est ainsi estimé à 940 le nombre maximum d'animaux adultes (âge > 6 semaines) de même sexe requis pour la mise en œuvre de cette demande.

Les procédures que nous appliquerons le seront dans le respect des trois valences de la démarche 3R. Remplacement : ne seront étudiées in vivo que des souches pour lesquelles nous aurons au préalable obtenu des données in vitro (infection de cellules) démontrant le rôle central de certaines protéines de *M. tuberculosis* lors d'une infection par des bacilles tuberculeux. Réduction : Seul le minimum d'animaux nécessaire à l'obtention de données statistiquement robustes sera utilisé. Les tests statistiques Mann-Whitney et ANOVA appliqués permettront d'effectuer les comparaisons avec des significativités statistiques. Raffinement : Les animaux sont hébergés et manipulés dans des isolateurs spécialement dédiés au sein d'une animalerie infectieuse de confinement A3. Un suivi strict des animaux sera opéré tout au long de l'expérience via une observation régulière pour détecter tout changement physique ou comportemental tel la piloérection ou encore la parésie qui précèdent généralement une perte de poids. S'il s'avérait que suite à l'apparition de ces symptômes, la perte de poids soit trop, les animaux seraient mis à mort avant la fin de la procédure. Le niveau de sévérité est ainsi considéré ici comme modéré.

9679 L'otite externe se définit comme une inflammation du revêtement cutané qui tapisse le conduit auditif externe (CAE). Cette inflammation s'étend parfois jusqu'au pavillon de l'oreille. Il s'agit d'une affection fréquente et souvent récidivante chez le chien. Une incidence de 10% à 20% est rapportée par la littérature. Bien que n'étant pas une maladie menaçant directement la vie, l'otite externe diminue la qualité de vie des animaux affectés. Ce d'autant plus, qu'une otite externe aiguë a tendance, spontanément, à devenir chronique.

Le pH cutané joue un rôle crucial dans l'homéostasie de la peau et dans la barrière épidermique. Un pH anormal peut être impliqué dans la pathogénèse de maladies de peau, telle que l'otite externe. Celui-ci va alors passer d'acide à alcalin lors de l'apparition de cette affection.

L'objectif de ce projet est de mettre en place plusieurs protocoles pour induire une alcalinisation cutanée du CAE chez le chien, par application d'une solution tampon à pH alcalin, afin d'évaluer, dans un second temps, l'efficacité de produits nettoyants à restaurer le « manteau acide » de l'oreille.

La première partie, l'étude de la cinétique de récupération d'un pH auriculaire physiologique après alcalinisation, sera faite sur 5 chiens. Un essai sur un chien sera d'abord réalisé, afin d'étudier la réaction et les conséquences induites par ce procédé.

Si les résultats sont concluants, 4 animaux supplémentaires seront utilisés. Cinq est le nombre minimum nécessaire afin d'obtenir des résultats scientifiquement pertinents et exploitables à l'aide de tests statistiques, selon l'avis d'un biostatisticien.

Dans un second temps, l'efficacité d'un traitement nettoyant acidifiant, déjà commercialisé, sera évaluée. Cette étude se fera, pour les mêmes raisons, sur 5 animaux.

La réponse aux questions scientifiques implique le suivi des différentes étapes permettant d'induire une alcalinisation ou de restaurer une acidité cutanée. Ce suivi sera fait par la mesure du pH auriculaire et l'observation du comportement de l'animal. Ainsi, des études chez l'animal vivant permettent de réunir tous ces paramètres.

Pendant toute la durée du projet, le confort optimal des animaux sera assuré par un enrichissement du milieu, à l'aide de jouets, de caresses ou récompenses lors des examens cliniques, et la mise en place de points limites.

Tous les gestes techniques seront effectués par du personnel entraîné spécifiquement pour le travail avec ces espèces animales.

En cas de réaction inflammatoire trop importante ou signes de douleurs extrêmes, le chien sera sorti de l'étude et traité avec un médicament adapté.

9680 La peau est indispensable à la survie de l'organisme. Elle assure une fonction de barrière, de protection vis-à-vis de l'environnement extérieur, de régulation de la température corporelle et participe aux défenses immunitaires. Lors d'agressions comme une brûlure, la perte de l'intégrité de la peau induit un profond déséquilibre physiologique pouvant aller jusqu'au décès, en particulier lors de septicémie. En effet, la mort du patient brûlé est le plus souvent causée par une infection bactérienne. L'une des infections les plus fréquentes est celle causée par la bactérie *Staphylococcus aureus*. L'incidence des brûlures dans le monde est telle que de nombreux laboratoires cherchent de nouvelles stratégies thérapeutiques. En 2004, environ 11 millions de personnes étaient concernées.

Le plasma est un gaz ionisé avec une température proche de la température ambiante. Son application au domaine médical est un sujet en pleine expansion car le plasma est source d'espèces réactives oxygénées et nitrées qui agissent sur des cibles biologiques avec des effets bactéricides et favorisant la différenciation cellulaire, le développement tissulaire et l'angiogenèse. Les expériences *in vitro* et *ex vivo* que nous avons réalisées sur des cellules de la peau et des cellules de vaisseaux sanguins ont donné des résultats positifs : le plasma stimule la prolifération et la migration des cellules *in vitro* mais aussi la création de nouveaux vaisseaux à partir de prélèvements de cellules de vaisseaux sanguins chez la souris.

Notre objectif est de démontrer les effets antibactériens du plasma dans un modèle de brûlure cutanée traitée par une greffe de peau, le traitement de référence pour les brûlures du troisième degré chez l'homme. Cette greffe sera ensuite infectée par *Staphylococcus aureus*. Nous testerons l'effet antibactérien du plasma mais aussi celui de l'oxyde nitrique (NO) et du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Le projet comportera une seule procédure (sévérité élevée) et 7 conditions thérapeutiques. Nous testerons également l'effet des traitements sur l'inflammation et la cicatrisation à l'aide de techniques d'imagerie intravitale non invasive et histologiques. La procédure entraînera des dommages certains (la brûlure cutanée) et pourrait entraîner des dommages liés à la diffusion sanguine des bactéries à partir du foyer cutané (endocardite, ostéomyélite, choc septique).

Pour respecter le principe des 3R (remplacement, réduction du nombre d'animaux, et raffinement), le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum lors de cette étude. Afin de limiter la souffrance et l'anxiété infligées aux animaux, toutes les souris seront traitées par une greffe de peau, la zone lésée sera bandée et 6 des 7 groupes bénéficieront de traitements complémentaires (antibiotiques, NO, H₂O₂). De plus la procédure se déroulera sous anesthésie (locale et générale) et des antalgiques seront utilisés pour diminuer la douleur et apaiser les animaux. Un dérivé morphinique sera administré 2 fois par jour et un antalgique sera placé dans l'eau de boisson. Pendant 48 heures après la brûlure, une réhydratation des animaux par injection de solution de Ringer sera réalisée et des hydrogels seront disposés dans les cages afin de faciliter l'absorption d'eau. Enfin, des points-limites ont été établis et entraîneront la mise à mort anticipée si l'état de l'animal se détériorait progressivement sans retour à la normale 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%. La surveillance des animaux sera journalière et les pansements des souris seront changés tous les jours. Le nombre d'animaux utilisés pour mener à bien ce projet sera réduit au strict minimum pour pouvoir conclure de façon statistiquement significative, à savoir 6 animaux par condition, à raison de 7 conditions, analysés à 3 temps distincts (pic inflammatoire, prolifération et maturation de la plaie), soit un total de 126 souris BALB/c femelles âgées de 8 semaines. Afin de juger de l'effet des traitements, un test de Student sera utilisé à condition que le test de normalité ne soit pas rejeté. Dans le cas contraire, un test non paramétrique de Mann-Whitney sera utilisé. Il n'existe pas d'alternative à l'expérimentation animale pour cette étude. En effet, le plasma, en distribuant des

espèces actives, agit non seulement sur les cellules cibles mais aussi sur l'équilibre moléculaire in vivo à la fois localement mais aussi de manière plus diffuse autour de la zone traitée. Afin de réduire le nombre d'animaux en expérimentation, la précision et la reproductibilité de la technique ont été validés précédemment sur des cellules cutanées isolées in vitro. De plus le protocole de brûlure ainsi que celui de la greffe ont déjà été mis en place et validés in vivo. Le bien-être des animaux sera primordial durant l'expérimentation, 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.

9681 Le Staphylocoque doré (*Staphylococcus aureus*) est une bactérie impliquée dans un grand nombre de pathologies telles que des infections cutanées, des pneumopathies, des endocardites ou des ostéomyélites. C'est une bactérie fréquemment rencontrée en portage asymptomatique et considérée comme un membre de la flore bactérienne naturelle de la peau et des muqueuses. Cependant, dans certaines conditions telles qu'une pathologie sous-jacente du sujet ou bien la rupture de la barrière cutanée en cas d'opération ou de blessure, cette bactérie va être véhiculée par le sang et se développer dans l'organisme. L'étude des facteurs et mécanismes bactériens permettant le passage de la forme non virulente associée au portage sain à la forme virulente retrouvée dans l'organisme de sujets malades présente des perspectives de développement de nouveaux candidats thérapeutiques contre les infections à Staphylocoque. En effet, en ciblant la virulence de la bactérie et non sa survie, ce type de stratégie pourrait éviter le développement de résistances.

Cette étude s'inscrit dans un projet débuté en amont qui a montré que lors de l'infection, l'ADN de la bactérie était modifié avec une perte d'un fragment d'ADN. L'étude proposée ici vise à montrer que cette modification de l'ADN de la bactérie est nécessaire à sa virulence.

L'utilisation d'un modèle animal, en l'occurrence la souris, est indispensable à la réalisation de ce projet puisque des études pilotes menées sur modèles cellulaires ont montré que l'évènement observé se produit lors de l'infection d'un organisme mais n'est pas transposable à l'échelle de l'infection cellulaire.

Ce projet prévoit l'infection de 290 souris pour une durée de 5 ans. Dans la première procédure, 140 souris seront infectées dans le but d'étudier l'impact de mutations génétiques de la bactérie sur la virulence. Pour cela, les souris infectées seront observées quotidiennement post-infection pendant une durée de 10 jours. Les souris tuées par l'infection seront comptabilisées afin de comparer l'effet de l'infection par différentes souches bactériennes. Des points limites seront définis (perte de mobilité, amaigrissement, et dans une moindre mesure aspect du pelage et mimiques faciales) et les animaux ayant atteint ces points limites seront mis à mort afin d'éviter toute souffrance inutile de l'animal. Parmi ces 140 souris, certaines atteindront néanmoins une classe sévère. Dans la seconde procédure, les autres souris, 150, seront infectées avec des doses a priori non létales de bactéries afin de quantifier la colonisation bactérienne de l'organe cible que nous étudions, le rein. Pour cela 5 jours post-infection, les souris seront mises à mort afin de prélever les reins. D'après les observations que nous avons pu réaliser, aucune souris ne devrait succomber à ce type d'infection et la durée limitée de l'infection pour prélèvements (5 jours) n'induirait pas de souffrance chez l'animal, nous considérons donc que le degré de sévérité sera modéré. Néanmoins, les mêmes points limites que ceux définis précédemment seront pris en compte en cas de souffrance et conduiront à la mise à mort prématurée de l'animal.

Le nombre d'animaux que nous infecterons a été défini d'après l'expérience que nous avons de ce type d'étude afin d'avoir des résultats significatifs au niveau statistique.

Les animaux seront hébergés en groupe dans des cages pourvues d'une litière adaptée et disposeront de nourriture et d'eau à volonté.

9682 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 de nouvelles thérapies chez les patients atteints d'hypertension pulmonaire, il est crucial d'appréhender au préalable ces nouvelles thérapies 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. Afin de déterminer l'efficacité des thérapies sur les animaux, un cathétérisme cardiaque droit sera effectué sur chaque animaux afin d'évaluer le degré d'hypertension pulmonaire. Puis, 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 (Remplacement, Réduction, Raffinement.). 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 70 sur l'ensemble de l'étude en combinant plusieurs approches expérimentales par différents expérimentateurs sur le même animal. Ainsi, au cours de ce projet nous évaluerons l'intérêt thérapeutique d'une thérapie génique par virus adéno-associé.

9683 La grande majorité des *Escherichia coli* (*E. coli*) sont des hôtes normaux de la flore intestinale humaine (microbiote) qui contribuent au maintien de l'homéostasie en participant à la digestion des aliments complexes et en empêchant la colonisation de l'intestin par des bactéries pathogènes. Cependant, certaines souches de *E. coli* pathogènes capables de sécréter des shiga-toxines, les STECs (Shiga-toxin producing *E. coli*), peuvent perturber cet équilibre suite à l'ingestion de seulement quelques dizaines d'entre elles et entraîner des colites hémorragiques aux conséquences parfois très graves pour l'hôte.

Bien que les adultes puissent être affectés par STEC (notamment dans le cadre d'épidémies ponctuelles, comme en Allemagne en 2011), ce sont majoritairement les enfants de moins de 5 ans qui sont touchés par les infections à STECs et qui sont les plus à risque de développer des complications rénales extrêmement graves (15-20%), parfois létales (1-5%) : le syndrome hémolytique et urémique (SHU).

De plus, aucune solution thérapeutique n'existe à ce jour pour soigner les patients atteints d'infections à STECs. En effet les antibiotiques sont contre-indiqués puisqu'ils peuvent favoriser un relargage massif des toxines par les bactéries et ainsi aggraver la pathologie. Dans ce contexte, notre société (ou laboratoire) développe une nouvelle génération d'antimicrobiens permettant d'éliminer spécifiquement les STECs dans l'intestin tout en évitant le relargage de toxines.

Dans ce contexte, nous utiliserons un modèle murin de colonisation intestinale à l'aide de souches de *Escherichia coli* nous permettant de reproduire au mieux la situation observée chez les patients infectés par STEC. Bien que les tests *in vitro* soient essentiels pour valider la capacité de notre technologie à éliminer une population bactérienne particulière (ie. STEC), ils ne permettent pas de récapituler la complexité du tractus gastro-intestinal chez l'Homme. Une démonstration de son efficacité dans une situation complexe chez l'animal est donc une étape essentielle afin de poursuivre notre développement vers une étude clinique.

Les souches de *Escherichia coli* n'étant pas des pathogènes intestinaux chez la souris, aucun désordre intestinal ne devrait se révéler au cours de ces expériences. En revanche, la sécrétion de toxines pourrait entraîner des complications rénales chez les animaux à l'instar de leur action chez l'Homme. C'est pourquoi, afin de réduire au maximum la souffrance animale, nous prévoyons d'utiliser, pour un maximum d'animaux, des souches de *E. coli* pour lesquelles les toxines auront été invalidées par génie génétique (KO).

Cependant, le principal objet de cette étude préclinique vise à valider la capacité de notre technologie à éliminer les STECs in vivo et à soigner les animaux infectés. De ce fait, nous ne pouvons nous restreindre à utiliser uniquement un modèle sans symptômes pour l'animal. C'est pourquoi, un suivi quotidien et minutieux sera organisé pour chaque animal infecté et des points limites d'étude (human endpoint) seront établis afin de minimiser l'impact sur les animaux. En ce sens, les animaux infectés présentant des symptômes cliniques avancés (perte de poids, aspect moribond, sang dans les selles etc.) seront immédiatement mis à mort.

Dans ce projet, nous prévoyons d'utiliser un total de 1135 souris sur 3 ans d'expérimentation réparties en quatre procédures distinctes. Trois d'entre elles, correspondant à 325 animaux, seront de classe de sévérité sévère par l'utilisation de souches STEC sécrétant des shigatoxines stx. Au contraire, les 810 souris qui seront utilisées dans la procédure restante, seront infectées avec des STEC invalidées pour la toxine et n'engendrant donc pas de pathologie sévère. Cette procédure sera donc de classe modéré pour la souffrance animale. Dans le but de réduire au maximum le nombre d'animaux tout en gardant un nombre suffisant pour une puissance statistique satisfaisante, un biostatisticien a été consulté afin d'évaluer nos besoins.

Les bénéfices attendus pourraient être de premier ordre car ils nous permettraient d'obtenir une stratégie efficace de lutte contre ces pathogènes sans pour autant affecter le reste du microbiote du fait la spécificité de la technologie employée.

Le recours à l'animal est nécessaire afin de tester une stratégie thérapeutique innovante dont l'efficacité a déjà été démontrée par des tests in vitro en laboratoire.

9684 En Europe, les cancers pédiatriques sont la première cause de mortalité infantile non accidentelle. 20% des enfants et adolescents diagnostiqués meurent encore chaque année et bien que 80% survivent, les deux tiers d'entre eux souffrent sur le long terme, d'effets secondaires associés aux traitements souvent non adaptés. Le développement de thérapies efficaces en oncologie pédiatrique est donc aujourd'hui devenu un enjeu majeur.

Ces dernières années, grâce à l'avancée des thérapies ciblées, une augmentation très importante de nouvelles drogues approuvées pour le traitement des cancers chez l'adulte a été enregistrée. En comparaison, seuls 2% du budget de la recherche sont alloués pour lutter contre les cancers pédiatriques et il existe peu d'options thérapeutiques accessibles aux enfants et adolescents atteints de cancer. Pour pallier ce retard, un appel d'offres a été lancé pour favoriser la création d'une plateforme unique regroupant chercheurs, médecins, industriels, associations de parents et commission européenne, et permettre le développement de systèmes de criblages performants dans le but de tester de nouvelles molécules ou des molécules développées ou en cours de développement chez l'adulte qui pourraient aussi être efficaces chez l'enfant.

Dans le cadre de la mise en place de cette plateforme, notre société est chargée de finaliser le développement de modèles de tumeurs humaines xénogreffées sur souris ou Patient Derived Xenografts (PDX) représentant au mieux l'hétérogénéité et la variété des cancers pédiatriques solides et d'utiliser ces modèles pour réaliser des "mouse trials" afin de dégager les meilleures thérapies potentielles dont pourraient bénéficier les enfants et les adolescents malades.

Le développement de modèles PDX est indispensable car ces modèles sont les seuls permettant de reconstituer la complexité des tumeurs humaines et bien que l'environnement cellulaire qui entoure les greffons est constitué de tissus de souris, ce sont sans doute les modèles qui s'approchent le plus de la maladie humaine. Ces PDX sont donc, à l'heure actuelle, les outils les plus performants pour mimer les réponses observées chez les patients en clinique et établir une liste des meilleurs traitements potentiels pour lutter contre les cancers pédiatriques.

Après concertation, l'ensemble des collaborateurs de ce projet ont également opté pour la réalisation de "mouse trials". Les "mouse trials" sont des études précliniques permettant d'évaluer, sur un nombre réduit de souris (n=1), l'efficacité et la toxicité de molécules sur une large cohorte de modèles de PDX. Parmi un très grand nombre de molécules à tester, incluant de nouvelles molécules ou les molécules développées ou en cours de développement chez l'adulte, et dont l'efficacité doit être démontrée chez l'enfant, les "mouse trials" sont une première étape vers l'identification des traitements les plus efficaces pour l'ensemble des cancers pédiatriques. Ce format d'étude permettra de réduire le champ d'investigation en diminuant le nombre important de

molécules à tester dans des études précliniques plus approfondies et donc de réduire le nombre global d'animaux utilisés.

Pour soulager au maximum l'inconfort, la douleur et l'angoisse subie par les animaux, les greffes seront pratiquées sous anesthésie réalisée par injection d'un mélange de xylazine et de kétamine. De plus, les souris seront regroupées au minimum par deux et au maximum par six dans des cages changées fréquemment et manipulées dans des conditions d'hygiène rigoureuses afin de garantir un statut sanitaire optimal. Les animaux seront monitorés quotidiennement (état physique et comportement) et le milieu est systématiquement enrichi avec du papier kraft, des bâtons de bois et des maisons en carton pourront être ajoutés.

Le nombre d'animaux utilisé (7040) sera le minimum requis afin de développer 80 modèles PDX sur 2 ans et dégager le plus grand nombre de molécules potentiellement efficaces qui pourront ensuite être développés en thérapies adaptées pour lutter activement contre l'ensemble des cancers pédiatriques solides.

9685 L'augmentation de l'espérance de vie au cours du siècle dernier est le reflet direct de l'amélioration du niveau de vie. Elle s'accompagne cependant d'une explosion spectaculaire de l'incidence des maladies liées à l'âge, maladies qui nuisent à la qualité de vie des personnes âgées. Permettre à ces personnes de rester actives et en bonne santé est ainsi devenu un défi majeur.

Or le vieillissement s'accompagne de changements importants dans la fonction et la composition du sang, conduisant à une diminution des défenses immunitaires, à une susceptibilité accrue aux infections et à une diminution de la réponse à la vaccination. Ces anomalies liées à l'âge résultent en grande partie d'altérations au niveau des cellules souches produisant les cellules sanguines, les cellules souches hématopoïétiques. Les mécanismes induisant cette altération restent encore très mal connus.

Des résultats préliminaires obtenus *in vitro* suggèrent que l'inflammation chronique, possiblement induite par des bactéries de l'intestin vieillissant, peut conduire à une modification de la structure des noyaux des cellules souches hématopoïétiques et ainsi inhiber leur capacité à produire des cellules sanguines. Pour vérifier cette hypothèse, nous désirons mettre en œuvre un modèle d'inflammation chronique chez la souris qui permettra de suivre l'impact de cette inflammation sur les cellules souches hématopoïétiques présentes dans la moelle osseuse. En particulier, nous observerons les conséquences de l'inflammation sur les mécanismes épigénétiques qui contrôlent l'expression des gènes régulant la production des différentes cellules sanguines. Les bénéfices attendus du projet sont une amélioration de notre compréhension du rôle de l'inflammation chronique dans le vieillissement des cellules souches du sang et l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques pour le développement de médicaments pour améliorer l'immunité chez les personnes âgées.

Pour ce projet, nous utiliserons un protocole déjà établi et couramment utilisé dans le domaine. Une inflammation chronique à bas bruit sera induite par l'injection dans la cavité abdominale de petites quantités d'une molécule d'origine bactérienne (le lipopolysaccharide ou LPS) sur une période de 4 semaines. Les doses injectées ont été ajustées pour induire le moins d'effet néfaste possible et maintenir le bien-être des souris. Un suivi quotidien des souris en expérimentation sera effectué afin de détecter les signes de souffrances (altérations physiques et/ou comportementales) qui conduiront à leur mise à mort par une méthode réglementaire. A la fin des injections, toutes les souris seront mises à mort puis nous prélèverons les cellules de leur moelle osseuse. Nous étudierons ces cellules par des techniques de biologie moléculaire afin de comparer leur état dans les souris injectées à celui observé chez des souris jeunes non inflammatoires ou des souris âgées. Le nombre d'animaux que nous estimons nécessaire repose sur notre expérience de la conception d'études de ce type. Nous utiliserons le nombre minimum d'animaux nécessaire pour obtenir des résultats significatifs. Les animaux seront hébergés en groupe, avec une litière appropriée et des matériaux de nidification. Tous les animaux seront mis à mort à la fin de la séquence d'injections.

La preuve de concept de ce projet a déjà été réalisée *in vitro*. En particulier, nous avons montré que dans des cellules exposées à un stress inflammatoire, l'expression des gènes gouvernant le destin cellulaire est modifié. Le recours à l'animal est maintenant nécessaire car nous cherchons désormais à caractériser les effets d'un état inflammatoire à l'échelle de l'animal sur les cellules

souches hématopoïétiques dans la moelle osseuse. Ces effets ne peuvent être étudiés que dans le contexte de l'animal entier.

Dans ce projet, nous utiliserons un total de 414 souris injectées au niveau de l'abdomen avec soit du sérum physiologique (207 souris), soit du sérum physiologique avec du LPS (207 souris), dans une procédure de sévérité modérée.

9686 Le mélanome cutané est le cancer de la peau le plus agressif. Une fois métastasé, les options thérapeutiques sont limitées et peu efficaces. Actuellement, il n'existe pas de technique spécifique pour imager spécifiquement ces cibles. Le but de cette recherche serait de développer une approche de nanomédecine permettant de cibler spécifiquement les métastases de mélanome pour l'imagerie de fluorescence et l'imagerie radioactive et dans un second temps la thérapie. Il s'agit ici d'une étude préliminaire dont le but est d'étudier le ciblage de ces nanoparticules.

L'objectif de cette étude préliminaire sera d'évaluer la biodistribution de nanoparticules par imagerie fluorescente ou radioactive sur souris porteuses de mélanome.

L'objectif de ces nanoparticules est de pouvoir proposer, un seul composé qui permette, en fonction du marquage, une approche diagnostique et théranostique multimodale exploitant les techniques d'imagerie de fluorescence et radioactive, et également de radiothérapie interne :

- imagerie de fluorescence : pour une application de détection peropératoire du ganglion sentinelle afin de détecter l'envahissement ganglionnaire par les cellules de mélanomes.

- imagerie scintigraphie de bilan d'extension; il faut préciser je pense que l'imagerie in vivo de bilan d'extension ne permet pas toujours de visualiser l'envahissement ganglionnaire in vivo, d'où la technique du ganglion sentinelle.

- une application radiothérapie interne vectorisée est également envisagée en mettant à la place de l'indium 111, du lutétium 177.

Il faut donc nécessaire de démontrer que toutes ces approches sont possibles et que les différentes techniques de marquage ne modifient pas les caractéristiques de ciblage tumoral, de biodistribution et de pharmacocinétique.

Ces nanoparticules seront injectées par voie intraveineuse ou par voie intra-tumorale. Deux types de nanoparticules seront étudiés : vectorisées vers la mélanine ou non vectorisées. De plus, deux fluorochromes et un radioélément (greffés sur les nanoparticules) seront évalués. La biodistribution sera évaluée au temps : 5min, 30 min, 2h, 6h et 24h. Pour ce projet, un total de 123 souris sera nécessaire, 63 souris (3 souris par temps) pour l'imagerie fluorescente et 60 souris (3 souris par temps) pour l'imagerie radioactive.

Le protocole proposé s'inscrit dans le respect de la règle des 3R (Remplacement, Réduction, Raffinement) pour l'expérimentation animale. En effet, le nombre d'animaux est réduit au maximum en sélectionnant uniquement les expérimentations essentielles. Des méthodes de raffinements sont utilisées avec un souci du bien-être animal (condition d'hébergement optimisés, portoirs ventilés, enrichissement de milieux, surveillance quotidienne, anesthésie des animaux,). Pour éviter au maximum l'angoisse ou la souffrance des animaux, les procédures seront effectuées sous anesthésie dès que cela sera possible. De plus, une surveillance quotidienne des animaux sera réalisée en surveillant les points limites (Perte de poids, Œil clos, diarrhée,). Toute observation d'un de ces point limites conduira à la sortie de l'animal du protocole et a son euthanasie. Cette décision sera prise par le responsable du projet. En cas de douleurs dues au développement tumorale, un traitement anti inflammatoire (ibuprofène 3mg/kg) pourra être ajouté dans l'eau de boisson, sous réserve que celui-ci n'interagisse pas avec le traitement anti tumoral. Cependant nous tenons à préciser que ce phénomène n'a jamais été observé par les différentes équipes ayant eu recours à ce type de modèle.

Au finale, cette étude préclinique devrait permettre de sélectionner un type de nanoparticules intéressantes pour l'imagerie des métastases mélanisées du mélanome grâce à une technique peu invasive.

9687 Environ 400 millions de personnes sont infectées chroniquement dans le monde par un virus, causant ainsi la mort de plus 2 millions de personnes chaque année. Quel que soit le virus (virus de l'hépatite B (VHB), virus de l'hépatite C ou virus de l'immunodéficience humaine), la seule option

thérapeutique réside en des traitements à vie par des molécules antivirales qui n'éliminent pas les cellules infectées, favorisent le risque de résistance virale et dont les effets nocifs à long terme restent inconnus. Afin de guérir ces personnes, de nouvelles stratégies appelées vaccinations thérapeutiques visent au contrôle de l'infection virale par le système immunitaire grâce à une vaccination spécifique. Pour rester au plus près de la situation réelle, l'évaluation des vaccins thérapeutiques chez l'animal doit être réalisée dans les mêmes conditions que celles qui seront utilisées chez l'homme. Dans une première procédure de sévérité modérée chez des souris naïves, nous nous assurerons que les réponses immunitaires générées par les vaccins ne sont pas inhibées par les traitements antiviraux.

Pour évaluer l'impact des traitements antiviraux sur la vaccination thérapeutique, nous disposons d'un modèle in vivo d'infection chronique liée au VHB chez la souris. Dans une deuxième procédure de sévérité modérée, nous déterminerons le temps minimal de traitement par les antiviraux nécessaires au contrôle de la charge virale. Deux autres procédures de sévérité modérée serviront à évaluer la capacité d'anticorps produits et testés in vitro à neutraliser le virus in vivo. Ces quatre procédures nous permettront de sélectionner les candidats vaccins, la durée des traitements antiviraux et la fréquence des injections d'anticorps à réaliser avant la vaccination thérapeutique. Ces procédures seront ensuite combinées dans une cinquième procédure de sévérité modérée afin d'apprécier l'efficacité des vaccins en combinaison avec les antiviraux et un traitement à base d'anticorps dans le cadre de l'hépatite B chronique.

Dans toutes les procédures, des tests statistiques seront appliqués afin réduire le nombre d'animaux à utiliser tout en garantissant que ce nombre d'animaux sera suffisant pour atteindre l'objectif fixé et valider les résultats obtenus.

Des expériences précédentes ont montré que nos vaccins thérapeutiques n'induisaient aucune souffrance chez l'animal. De plus, notre étude porte sur l'injection de substances non toxiques dont la plupart sont déjà utilisées chez l'homme. Néanmoins, un suivi quotidien des animaux sera effectué et des points limites bien définis pour éviter toute souffrance. Des expériences préliminaires in vitro nous permettront de limiter le nombre de vaccins à évaluer mais l'expérimentation animale reste requise car ce sont les réponses immunitaires dans un contexte d'infection chronique in vivo qui sont étudiées.

Au maximum 1424 souris seront utilisées, et ce sur une durée de 5 ans. Le bénéfice attendu du projet est non seulement de montrer que des vaccins thérapeutiques peuvent être utilisés lors de traitement antiviraux mais également de valider des protocoles thérapeutiques permettant la guérison des porteurs chroniques de virus.

9688 Le gavage est une pratique légale (directive européenne 98/58/CE), mais controversée car jugée non respectueuse du bien-être animal. Dans ce contexte, il devient indispensable pour la filière palmipède à foie gras de disposer d'une méthode d'évaluation du bien-être des canards pendant la phase de gavage afin de permettre un diagnostic de l'état des animaux et d'identifier les éventuelles marges de progrès. L'objectif du projet est de mettre au point une méthode d'évaluation multicritère du bien-être des canards en gavage permettant ce diagnostic et l'identification de ces progrès possibles. Pour cela, nous testons sur un lot de 384 canards une méthode utilisable dans les fermes et reposant sur des indicateurs mesurés sur l'animal, sans manipulation ni contention. Ces indicateurs mesurés visuellement par un observateur circulant dans le bâtiment, seront testés lors de deux phases successives afin de s'assurer de leur qualité et de les valider. A cette fin, une grille d'évaluation comportant plusieurs indicateurs sera testée en 2 temps :

Phase 1 : Répétabilité et robustesse des indicateurs

Durant 2 semaines (70 à 84j d'âge), nous mesurerons les indicateurs sur 384 canards logés et alimentés dans les mêmes conditions que pendant la phase de gavage mais maintenus dans un état physiologique stable, sans objectif de conduire à une augmentation de la taille du foie. L'objectif est de vérifier l'effet de certaines variations de condition de mesure sur les valeurs des indicateurs. Seront testés de manière randomisée les effets suivants :

- Lumière (éteinte/allumée)
- Heure de visite (repas + 2h, repas + 5h, repas +8h)
- Observateur (observateur 1/observateur 2)

Phase 2 : Justesse et sensibilité des indicateurs

Afin de vérifier la capacité des indicateurs à détecter des écarts de bien-être, les animaux seront soumis à des programmes nutritionnels induisant des sollicitations faibles à fortes de leurs capacités d'adaptation. Pour cela les canards seront répartis, après une phase d'adaptation, en 4 lots en combinant deux facteurs : une quantité d'aliment qui aura pour objectif d'obtenir un poids de foie gras de 500g ou 650g et une durée de gavage de 13 ou 21 repas. Afin d'évaluer la justesse de la méthode, les mesures obtenues seront comparées à des mesures de références individuelles (pesée et évaluation visuelle de l'état corporel) réalisées elles par manipulation des animaux avant et à la fin des périodes.

Respect de la règle des 3 R :

- Réduire le nombre d'animaux en expérimentation : Les deux phases du projet n'impliquent qu'un seul et même lot d'animaux sur lequel seront réalisées essentiellement des mesures visuelles, sans manipulation ni contention. Le nombre d'animaux utilisés est estimé pour pouvoir détecter un écart entre les quatre groupes comparés pendant la phase 2.
- Raffiner la méthodologie utilisée, ce qui implique la notion de points limites (critères d'interruption, ou "end-points") : Des points limites ont été définis pour les deux phases de l'expérience. Les conditions d'hébergement des animaux sont conformes à la réglementation en vigueur dans la filière. Le nombre de manipulation est limité à 3 pesées couplées à une évaluation de l'état corporel. Le protocole n'implique pas de procédure induisant de la douleur.
- Remplacer les modèles animaux : Nous ne pouvons pas utiliser de méthode substitutive puisqu'il s'agit de l'évaluation des animaux.

9689 Le virus T lymphotrope humain de type 1 (HTLV-1) infecte les cellules immunitaires, notamment les lymphocytes T appelés CD4+, et induit leur prolifération. L'infection persiste à vie et entraîne, chez 2 à 5% des individus infectés, une prolifération maligne des lymphocytes appelée leucémie ou lymphome T de l'adulte (ATLL). La forme aigüe de ce cancer, la plus fréquente, est fatale avec une moyenne de survie de 6 mois. A ce jour, aucun traitement efficace n'est disponible, et une greffe de moelle osseuse ne permet que de prolonger légèrement l'espérance de vie des patients ATLL. Le développement de nouveaux traitements contre cette pathologie est d'autant plus difficile que parmi les modèles animaux, seul le primate non humain peut être infecté par le virus puis développer une leucémie après plusieurs dizaines d'années. Par conséquent, il est nécessaire de tester l'efficacité de nouveaux traitements sur d'autres modèles.

Le but de ce projet est d'établir de nouvelles lignées cellulaires à partir de cellules cancéreuses de patients ATLL. Ces lignées permettront à l'avenir de tester in vitro et in vivo (études précliniques) l'efficacité de nouvelles molécules antivirales et/ou anticancéreuses. Les lignées cellulaires disponibles actuellement sont très anciennes, elles se sont adaptées à la culture en laboratoire, et diffèrent trop des lymphocytes de patients pour pouvoir être utilisés dans ce but.

La méthodologie utilisée sera analogue à celle implémentée avec succès dans le cadre de l'étude d'une autre leucémie : la leucémie aigüe lymphoblastique T (LALT). Cette technique consiste en l'injection de lymphocytes de patients ATLL à des souris immunodéprimées (afin qu'elles ne rejettent pas cette « greffe » de cellules humaines). Les cellules cancéreuses du patient pourront ensuite proliférer et s'adapter à un environnement murin. A la fin de l'expérience, ces cellules cancéreuses (appelées lignée PDX) seront récupérées et pourront être utilisées à plus grande échelle, in vitro ou chez la souris, afin de mieux appréhender les mécanismes de la leucémogénèse et évaluer l'effet de nouveaux traitements. Le but de ce protocole est de récupérer 10 à 12 nouvelles lignées PDX afin de représenter au mieux la diversité existante des cas d'ATLL.

Respect des 3R :

Remplacement : La leucémogénèse est un mécanisme complexe qui ne peut être appréhendé sur de seules études in vitro. De même, les essais de nouveaux traitements en études précliniques, comme ceux réalisés pour la leucémie LALT, nécessitent l'utilisation d'un modèle animal. Le seul autre modèle disponible est le modèle primate.

Réduction : La quantité de cellules de patient récupérées puis purifiées permettra d'injecter 3 à 4 souris par groupe. Statistiquement, les expériences de ce type réalisées pour la leucémie LALT ont

donné lieu à environ 55% de réussite, c'est-à-dire que l'injection d'environ 1 groupe de souris sur deux a permis la prolifération des cellules humaines et l'isolation d'une nouvelle lignée. Cependant, le taux de réussite dans le cadre de l'ATLL est encore inconnu, et deux lignées de souris seront testées dans une première procédure pour optimiser le protocole expérimental. Par conséquent, pour obtenir 12 nouvelles lignées ATLL, nous évaluons qu'au maximum, il nous faudra utiliser 208 souris.

Ce projet porte sur la création de lignées cellulaires et non sur une analyse de résultats, par conséquent nos résultats seront d'ordre binaire (réussite ou échec) et ne pourront faire intervenir d'analyse statistique.

Raffinement : Après injection des cellules cancéreuses sur les souris ; l'apparition de signes de souffrance sera contrôlée régulièrement et engendra immédiatement leur mise à mort. De plus, une prise de sang sera réalisée chaque semaine afin de contrôler le taux de cellules leucémiques dans le sang des souris. Les souris seront mises à mort soit dès l'apparition de signes de souffrance, soit lorsque le taux de cellules leucémiques dans leur sang atteindra 80%.

Les souris utilisées seront des souris immunodéprimées mâles et femelles, âgées de 7 à 15 semaines en début d'expérience ; chaque expérience durera au maximum un an.

Ce projet, prévu pour une durée de 5 ans, comprend 2 procédures avec un degré de sévérité modéré.

9690 Le paludisme, également connu sous le nom de malaria, est une maladie infectieuse causée par le parasite *Plasmodium* transmis à l'Homme par piqûre d'un moustique infecté. Fléau économique et sanitaire, le paludisme constitue, avec près de 500 000 morts par an, la première parasitose et la troisième cause de mortalité au monde après la tuberculose et le SIDA et touche principalement l'Afrique subsaharienne, l'Asie du Sud-Est et l'Amérique du Sud. Le neuropaludisme est une des plus graves complications du paludisme qui affecte essentiellement les enfants de moins de 5 ans. Cependant, sa physiopathologie n'est pas encore bien cernée chez l'Homme à cause de la localisation cérébrale de ce syndrome, ne permettant que des études post-mortem. La mise en place des modèles expérimentaux est donc indispensable afin d'étudier la pathogénie de la maladie, les différents mécanismes physiopathologiques liés à cette pathologie et de tester de nouveaux traitements. La plupart des études sont réalisées sur la souris. Cependant, le modèle « neuropaludisme souris » est très discuté voire critiqué aujourd'hui car il semble développer des signes très éloignés de la pathologie humaine. Dans ce contexte et dans le respect de la règle des 3R, un modèle de neuropaludisme décrit chez le rat présente une grande similarité avec le neuropaludisme humain. L'objectif actuel de notre travail est d'évaluer l'efficacité de molécules antipaludiques sur ce modèle de neuropaludisme. Les rats seront infectés par une souche murine de paludisme. Dès les premiers signes cliniques de neuropaludisme constatés, les rats seront répartis alternativement en 2 groupes, traités et non traités afin d'évaluer l'effet de la molécule étudiée sur les signes cliniques et parasitologiques. Une grille de surveillance journalière est mise en place pour effectuer un relevé détaillé de l'état général de chaque animal et ainsi contrôler les points d'arrêt. Les expérimentateurs, tous titulaires d'une formation en expérimentation animale, seront particulièrement attentifs aux points limites définis en amont afin d'anticiper les risques de douleur des animaux. Pour chaque expérience, 43 rats et 20 souris seront utilisés. Trois expériences par an pourront être effectuées soit 129 rats/an et 60 souris/an (= 189 animaux/an soit 945 sur les 5 ans). Cependant, ces chiffres correspondent à une estimation haute maximale car le nombre d'expériences effectuées pourra être inférieur. Ce projet préclinique est effectué dans le cadre du respect de la règle des 3R avec un nombre d'animaux minimum nécessaire choisi sur la base d'une étude statistique, des conditions d'hébergement adaptées et une surveillance accrue.

9691 L'imagerie moléculaire non invasive en tomographie par émission de positrons (TEP) consiste à explorer un processus physiologique ou pathologique après avoir administré par voie intraveineuse un composé radioactif qui va se fixer spécifiquement sur une cible biologique. Cette méthode a démontré son intérêt majeur en oncologie, à la fois pour le diagnostic, le suivi, l'évaluation thérapeutique, et la détection de métastases ou de récidives. Il a été montré qu'un canal ionique porté par différentes cellules, appelé « canal potassique SK3 », a un rôle majeur dans la migration

de cellules de cancer du sein et de la prostate. L'exploration de ce canal par imagerie serait donc particulièrement pertinente en clinique, notamment pour détecter des métastases, mais est à ce jour impossible car aucun traceur radioactif spécifique n'existe pour réaliser cette exploration. Le présent projet vise à valider un tel traceur, en démontrant que, chez l'animal, il se fixe bien de manière spécifique à la cible après administration intraveineuse. Cette étape est indispensable avant de pouvoir proposer une éventuelle utilisation en clinique.

Ce projet expérimental nécessite l'utilisation de 30 souris Swiss.

Il répond aux exigences des 3R, à savoir :

Remplacement : Cette étude de caractérisation in vivo sur des rongeurs ne peut être substituée par une méthode alternative in vitro ou sur cellules. En effet, le traceur doit être capable de se fixer in vivo sur la cible visée (ici canal SK3), après une injection intraveineuse, comme lorsqu'il pourra être utilisé en clinique.

Réduction : L'utilisation de l'imagerie permettra de réaliser une cinétique d'accumulation du traceur dans le corps entier de l'animal à différents temps après une injection (suivi durant 2 heures). Ceci permettra de définir le temps optimum qui sera utilisé dans l'étape suivante. Sans l'imagerie, il faudrait euthanasier plusieurs animaux à différents temps (par exemple à 30, 60, 120, 180 minutes).

Raffinement : Le nombre de souris par cage de 800 cm² sera décidé en fonction de leur répartition lors de leur livraison, afin de ne pas induire de stress lié à la rencontre d'autres congénères. Les animaux auront un enrichissement varié (Nestlests, tunnel en plastique, mouse smart home). Toutes les stratégies d'analgésie, d'anesthésie et de soin seront mises en œuvre pour réduire au maximum tout inconfort qui pourrait être induit par le modèle.

9692 Nous nous proposons d'utiliser un modèle murin de septicémie, déjà au point au laboratoire, afin d'identifier les facteurs de virulence des bactéries pathogènes connues pour être responsables de la maladie. Nous nous concentrerons sur l'importance du fer (pour la bactérie et pour l'organisme infecté) dans le développement de la maladie. Des bactéries génétiquement modifiées pour présenter une capacité plus ou moins grande à capter le fer et/ou inactivées dans les gènes de biosynthèse de certains facteurs de virulence seront utilisées. Des souris génétiquement modifiées pour présenter des niveaux variés de fer disponible seront incluses dans ce modèle.

108 bactéries seront injectées dans le coussinet plantaire d'une patte arrière de la souris. Le sang et les organes clés (foie, rate, duodénum, pancréas, cœur, rein, thymus, cerveau) seront prélevés à intervalles réguliers (t=4h, 20h et 27h post infection) afin de quantifier la dissémination bactérienne mais aussi afin de mesurer les marqueurs biologiques intervenant dans la régulation du fer de l'organisme infecté. Dans une deuxième série d'expériences les vésicules de membrane externe (OMV) produites par ces mêmes souches bactériennes seront utilisées pour l'infection des souris. Les souris seront analysées de la même façon que décrit précédemment.

Au total, 1548 souris seront nécessaires, sur une période de 5 ans pour la complétion de ce projet. Pour ce projet, il faut combiner la variable « souche bactérienne » (produisant plus ou moins de systèmes de captation du fer et de facteurs de virulence), et la variable « fond génétique de la souris » (concentration de fer dans le sang modulé selon la souris utilisée). Ceci multiplie les conditions expérimentales et donc le nombre d'animaux requis. Néanmoins le projet a été élaboré de façon à réduire au maximum le nombre de souris requises, tout en incluant le nombre minimum d'animaux afin de réaliser des analyses statistiques robustes. Tous les moyens seront mis en œuvre pour respecter les règles des 3R. Le bien-être de l'animal sera en permanence au centre de nos préoccupations. Les souris sont hébergées dans des cages à 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. 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. Tout animal présentant des signes de douleur, souffrance ou angoisse sera euthanasié.

Aucune expérimentation alternative ne peut remplacer l'aspect in vivo de ce projet dont le but est d'étudier l'impact de facteurs de virulence produits par E. coli sur le développement de la septicémie. Cette étude nous permettra d'approfondir nos connaissances concernant la guerre que se livrent

les bactéries et leur hôte pour l'utilisation du fer avec pour objectif ultime l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques contre les septicémies.

9693 Le mélanome est un des cancers de la peau les plus difficiles à traiter du fait de sa capacité à former des métastases et de sa résistance aux traitements. Au cours des 10 dernières années, la prise en charge du mélanome au stade métastatique a connu une révolution grâce aux thérapies ciblées et aux immunothérapies. Toutefois, ces traitements ne bénéficient qu'à certains patients et leur efficacité dans le temps est limitée par l'apparition rapide de résistances. Comprendre les mécanismes responsables de l'échappement du mélanome à ces thérapies est primordial pour en améliorer l'efficacité et en prolonger les effets.

Au sein d'une tumeur, les cellules cancéreuses "baignent" dans un environnement complexe composé de cellules stromales (fibroblastes activés, cellules endothéliales et cellules immunitaires) et de la matrice extracellulaire. La matrice extracellulaire est composée de protéines (collagènes, fibronectine, dont la quantité augmente au cours la progression du mélanome, conduisant à sa rigidification. Plusieurs études ont montré que l'augmentation de la rigidité de la matrice extracellulaire influence la progression et la réponse thérapeutique de plusieurs cancers (sein, pancréas, prostate). Toutefois, la nature et l'influence de ces signaux sur la progression et la réponse thérapeutique du mélanome sont encore peu connues. Le but de notre projet est de déterminer le rôle joué par le microenvironnement, en particulier ses changements de rigidité, dans la progression et la résistance thérapeutique du mélanome.

Compte tenu de la complexité du microenvironnement tumoral, aborder cette question par des analyses in vitro n'est pas suffisant et le recours à un modèle murin reste indispensable. Dans un effort de remplacement, nous avons réalisé un certain nombre d'expériences in vitro. Les résultats que nous avons obtenus justifient de passer à présent à l'expérimentation in vivo. Pour déterminer le nombre minimum d'animaux nécessaires pour ce projet, nous avons utilisé le logiciel d'analyse de puissance G. Power. Aucune influence du sexe n'étant rapportée par rapport aux modèles expérimentaux décrits dans ce projet, nous n'aurons pas à doubler nos expériences sur les deux sexes, ce qui permettra de réduire le nombre d'animaux à utiliser. Un effort de raffinement sera également réalisé en utilisant préférentiellement des femelles de façon à limiter les risques de blessures consécutives aux agressions entre congénères. Pour réduire l'angoisse des animaux, nous hébergerons 6 souris/cage dans des conditions enrichies d'élevage (igloo en polycarbonate et une tigelette en papier irradié pour permettre la nidification). Enfin, lorsque ce sera possible, nous aurons recours à l'utilisation de techniques d'imagerie non invasive pour suivre l'évolution de la tumeur, afin de prendre en compte et soulager au plus tôt toute douleur manifestée par les animaux. Nos travaux devraient permettre de mieux comprendre les processus responsables de la formation de métastases et de l'échappement au traitement et pourraient à terme permettre d'identifier de nouvelles pistes thérapeutiques pour le mélanome. Pour ce projet, nous utiliserons 2544 souris.

9694 Le cancer du sein est une maladie hétérogène, dont les classifications histologiques et cliniques actuelles ne permettent pas de prédire totalement l'évolution. Les chances de guérison dépendent du type de cancer et de son stade d'évolution au moment où on entreprend les traitements. Actuellement, cinq sous-types sont bien individualisés : luminal, basal, HER2+, normal et triple négatif. La plupart des cancers du sein triple négatif et de type basal sont des tumeurs agressives, ou de haut grade. Cela signifie qu'ils ont tendance à se développer et à se propager rapidement. Beaucoup sont diagnostiqués à un stade avancé, alors que le cancer s'est déjà propagé (métastases) aux ganglions lymphatiques ou à d'autres organes. Des observations récentes conduisent à poser l'hypothèse selon laquelle les caractéristiques de ces sous-type tumoraux, de mauvais pronostic, sont attribuable à la réactivation d'un programme embryonnaire : la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). La TEM est un processus physiologique, intervenant majoritairement au cours de l'embryogenèse, permettant à la cellule de changer de morphologie et d'acquérir des capacités de migration. Ce processus, finement contrôlé, est indispensable à la formation de l'embryon et reste peu présent dans les cellules adultes. La TEM est retrouvée dans les phases tardives des cancers, afin de promouvoir notamment l'invasion métastatique. Plus récemment, le mécanisme de la TEM a été impliqués dans les phases initiatrices du développement

tumoral, en mettant en évidence la capacité de favoriser l'apparition des cancers et la progression tumorale. Le programme scientifique que nous proposons, a comme objectif de mieux caractériser les mécanismes impliqués dans ce processus et de déterminer si la réactivation de la TEM est responsable des caractéristiques agressives de certains cancers du sein. Ce programme s'articule autour de 2 objectifs principaux : 1-La caractérisation de l'activité oncogénique des facteurs de la TEM dans les phases précoces de la cancérogenèse ; 2- Établir les conséquences de cette activité oncogénique sur l'hétérogénéité tumorale et l'évolution cancéreuse. Au-delà de leur intérêt cognitif, à terme ces objectifs ambitionnent de proposer des approches permettant de bloquer ces mécanismes et de prévenir ainsi certaines voies de résistance aux thérapeutiques anti-cancéreuses afin de permettre une meilleure prise en charge thérapeutique des patients. Ce projet a une durée maximale de 5 ans et a été validé par des approches in vitro mais exige des études in vivo réalisées sur des modèles de tumorigénèse mammaire. Comme modèle d'étude nous avons choisi d'utiliser la souris puisqu'il est l'espèce animale la plus pertinente pour les études de cancérogenèse mammaire. Ils existent plusieurs modèles murins de cancer du sein qui reproduisent la pathogenèse humaine avec les mêmes caractéristiques histologiques. L'étude est développée essentiellement autour de deux approches complémentaires : la première est basée sur un modèle de souris transgénique exprimant l'oncogène c-MYC de façon inductible, qui présente des caractéristiques de la TEM dans les tumeurs formées. La seconde repose sur des modèles cellulaires transplantés chez des souris immunodéprimées qui permettront de déterminer si la TEM est indispensable à la transformation tumorale. Cette stratégie d'étude nous permettra de déterminer l'impact de l'expression de la TEM dans l'initiation et le développement tumoral in vivo. La mise en place de ce projet demande la génération de différents groupes expérimentaux de souris pour un total de 685 souris maximum. Un support en biostatistiques est apporté par des experts afin d'optimiser les méthodes expérimentales employées et réduire le nombre d'animaux utilisés. Dans les xénogreffes de cellules humaines primaires nous allons réaliser une étude pilote dont la taille des groupes expérimentaux sera fixée à n=5 animaux/condition. Ces études ont comme objectif d'optimiser les conditions pour obtenir une prise tumorale optimale chez la souris. Les résultats obtenus dans cette expérience nous permettront de réduire les groupes d'animaux au minimum dans les expériences successives afin que l'étude soit statistiquement et scientifiquement acceptable. Pour les autres procédures les groupes d'animaux ont été réduits au minimum afin que l'étude soit statistiquement et scientifiquement acceptable. Une surveillance adaptée des animaux sera effectuée afin d'observer toute douleur ou souffrance éventuelle qui sera prise en charge. Les points limites ont été déterminés au préalable par des études précédentes réalisées au sein de notre centre. Les souris seront observées de 2 à 3 fois par semaine. La fréquence des observations augmentera pour être journalière si besoin en fonction de l'augmentation potentielle de la souffrance ou de la détresse des animaux. Les prélèvements obtenus à partir des souris seront analysés in situ et in vitro pour des expériences in vitro ultérieures, permettant d'obtenir à partir d'une même souris plusieurs données expérimentales.

9695 Ce projet fait suite au projet « rôle du circuit amygdale-cortex insulaire dans le risque persistant de rechute » et 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. Par conséquent, pour mettre en place des stratégies thérapeutiques adéquates, il est fondamental d'identifier les circuits neuronaux spécifiquement impliqués dans la rechute, ainsi que la nature des éventuels dérèglements de ces réseaux. Nous avons précédemment montré certaines modifications persistantes de la voie amygdale-cortex insulaire après prise chronique de cocaïne. Ce nouveau projet a pour but de déterminer de nouvelles modifications persistantes et d'étudier l'effet de différents produits pharmacologiques et de différents protocoles de stimulation afin de restaurer une activité électrique normale de la voie amygdale-cortex insulaire, et ainsi de diminuer la rechute. Nous utiliserons un modèle animal de l'addiction (auto-administration de cocaïne) et nous allons le coupler à des approches

pharmacologiques, électrophysiologiques et pharmacogénétiques pour étudier des régions cérébrales qui participent au processus de rechute chez le rat (l'amygdale et le cortex insulaire).

Ce projet est constitué de 4 procédures. La procédure 1 correspond à une chirurgie qui permettra l'implantation d'un cathéter dans la veine jugulaire des rats. La procédure 2 correspond à l'exposition des animaux à des cages opérantes et à une période de sevrage. La procédure 3 correspond aux enregistrements électrophysiologiques in vivo chez le rat anesthésié. La procédure 4 correspond à une chirurgie stéréotaxique. Dans ce projet, nous avons pris en considération la règle des 3Rs (remplacer, réduire et raffiner). Ce type de recherche, visant à comprendre les bases d'un processus psychologique, peut être uniquement menée sur un animal vivant (remplacer). Nous minimiserons le nombre d'animaux utilisés par des méthodes expérimentales validées et reproductibles ainsi que des méthodes statistiques appropriées de type ANOVA (réduire). Les animaux subissant une chirurgie seront traités pour de possibles douleurs post-opératoires (raffiner). Nous avons calculé que pour cette étude 590 rats seront nécessaires pour obtenir des données qui seront analysables statistiquement.

Cette recherche innovante fournira des informations critiques pour la compréhension des mécanismes sous-jacents aux risques persistants de rechute et pourra avoir un impact sur la prise en charge des maladies psychiatriques chez l'Homme.

9696 Avec 54 062 nouveaux cas en France métropolitaine en 2015, le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez la femme d'après les données de l'Institut National du Cancer. C'est aussi celui qui cause le plus grand nombre de décès chez la femme, avec 18,2 % des décès féminins par cancer. Le cancer du sein dit HER2 positif représente environ 15% des cancers du sein et est défini par l'absence d'expression des récepteurs aux œstrogènes et à la progestérone mais à la présence de l'expression/l'amplification de HER2. C'est un type de cancer agressif dû, en partie, à la protéine HER2, qui a un impact important sur la régulation de la prolifération cellulaire, en nombre anormal à la surface des cellules cancéreuses. De ce fait, la croissance de la tumeur est plus rapide et plus importante. Plusieurs études ont montré que les nouvelles thérapies ciblées visant l'EGFR permettraient de restaurer l'expression des récepteurs aux œstrogènes et donc une cible thérapeutique. Actuellement, le statut des récepteurs aux œstrogènes est défini par les méthodes immunohistochimies, néanmoins, un nouveaux radiotraceurs, le 18F-fluoroestadiol (18 F-FES), permet l'imagerie de tomographie par émission de positon (TEP) in vivo de ces récepteurs. L'objectif de ce projet est de développer un modèle murin de xénogreffe de cellules humaines de cancer du sein HER2 afin de pourvoir étudier la possible restauration de l'expression de récepteurs aux œstrogènes par imagerie TEP au 18F-FES sur ces tumeurs suite à une pression thérapeutique. La mise au point de ce modèle murin sera évaluée sur 15 souris femelles âgées de 4 semaines par groupe sur trois types de souches immunodéprimés soit un total de 45 souris. Le protocole proposé s'inscrit dans le respect de la règle des 3R (Remplacement, Réduction, Raffinement) pour l'expérimentation animale. En effet, le nombre d'animaux est réduit au maximum en sélectionnant uniquement les expérimentations essentielles. Des méthodes de raffinements sont utilisées avec un soucis du bien-être animal (condition d'hébergement optimisés, portoirs ventilés, enrichissement de milieux, surveillance quotidienne, anesthésie des animaux). Pour éviter au maximum l'angoisse ou la souffrance des animaux, les procédures seront effectuées sous anesthésie dès que cela sera possible. De plus, une surveillance quotidienne des animaux sera réalisée en surveillant les points limites (Perte de poids, œil clos, diarrhée.). Toute observation d'un de ces point limites conduira à la sortie de l'animal du protocole et à son euthanasie. Cette décision sera prise par le responsable du projet. En cas de douleurs dues au développement tumorale, un traitement anti inflammatoire (ibuprofène 3mg/kg) pourra être ajouté dans l'eau de boisson, sous réserve que celui-ci n'interagisse pas avec le traitement anti tumoral. Cependant nous tenons à préciser que ce phénomène n'a jamais été observé par les différentes équipes ayant eu recours à ce type de modèle.

Au final, cette étude préclinique devrait permettre de valider un nouveau modèle murin de xénogreffe de cancer du sein qui pourra être utilisé dans des études ultérieures pour le développement de l'utilisation de nouveaux radiopharmaceutiques.

9697 *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.

Lors de deux études princeps, 2 mélanges de souches de *Lactobacilli* issus de patients atteints de mucoviscidose ont été formulés sur la base de leur activité contre le *Pseudomonas* et plus précisément sur leur capacité *in vitro* à inhiber la production de 2 armes de virulence de *P. aeruginosa* : l'élastase et la pyocyanine. L'élastase est une protéase dégradant l'élastine du tissu conjonctif et conduisant à une destruction tissulaire (en particulier pulmonaire). La pyocyanine est un pigment redox actif aux multiples actions parmi lesquelles l'inhibition de la respiration cellulaire ou l'apoptose des polynucléaires neutrophiles. Ces 2 mélanges ont ensuite été administrés par voie intranasale de manière préventive dans un modèle murin d'infection pulmonaire à *P. aeruginosa*. Nous avons démontré que le traitement préventif respiratoire à base de *Lactobacilli* augmentait de manière significative la survie des animaux à 7 jours et diminuait de façon significative la quantité bactérienne pulmonaire à *P. aeruginosa* 24h post-infection, par rapport au groupe de souris n'ayant pas reçu les *Lactobacillus*, et ce quel que soit le mélange administré. Cependant, une meilleure élimination pulmonaire du pathogène ainsi qu'une amélioration de la survie a été observées lors de l'administration du mélange de *Lactobacillus psb* par rapport au mélange *Lactobacillus frf*.

Ces résultats prometteurs, nous mènent désormais à rechercher, au sein du mélange *Lactobacillus psb*, la souche ou le mélange de *Lactobacillus* au meilleur potentiel antipseudomonal *in vivo* dans un modèle de pneumonie aiguë à *Pseudomonas aeruginosa* et explorer les mécanismes d'action immunologiques mis en jeu.

Le critère de jugement principal sera la quantité de *P. aeruginosa* dans le poumon 24 heures après l'instillation du pathogène.

Une étude des dommages tissulaires par coloration histologiques ainsi que des dosages de molécules immunitaires pulmonaires et sanguins seront réalisés 24 heures après l'infection à *P. aeruginosa*.

Nous utiliserons 9 groupes de 7 souris chacun, soit 63 souris au total :

- Groupe contrôle *P. aeruginosa*
- Groupe contrôle mélange *Lactobacillus psb*
- Groupe contrôle *Lactobacillus paracasei*
- Groupe contrôle *Lactobacillus salivarius*
- Groupe contrôle *Lactobacillus brevis*
- Groupe mélange *Lactobacillus psb* + *P. aeruginosa* :
- Groupe *Lactobacillus paracasei* + *P. aeruginosa* :
- Groupe *Lactobacillus salivarius* + *P. aeruginosa* :
- Groupe *Lactobacillus brevis* + *P. aeruginosa* :

L'ensemble de ce projet respecte les principes de remplacement, réduction et raffinement. En effet les *Lactobacillus* ont été sélectionnés *in vitro* dans un premier temps (principe de remplacement), le nombre d'animaux a également été réduit au maximum sans compromettre les objectifs du projet (principe de réduction) et les procédures expérimentales utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible la douleur et/ou l'angoisse des animaux (principe de raffinement).

9698 La détermination des coefficients de digestibilité des nutriments de la ration du porc et la compréhension des réponses plasmatiques suite à l'ingestion d'un repas permet de formuler des aliments au plus près des besoins des animaux en fonction de leur stade physiologique. Cela permet également de limiter les rejets de polluants par les fèces et les urines dans l'environnement et d'utiliser les ressources végétales de manière efficiente. Pour évaluer la digestibilité des nutriments chez le porc, il convient de les placer en loge individuelle afin de mesurer précisément l'ingéré et les quantités de fèces et d'urine excrétées. Dans un premier temps, les porcs seront placés par paire de poids similaires dans une aire d'adaptation pendant 8 jours afin qu'ils s'adaptent

au régime expérimental. Le logement par paire permet également aux animaux d'interagir. Les porcs seront ensuite logés individuellement pendant 7 jours dans le but de réaliser les mesures de digestibilité. Cette période de 7 jours se décompose en 2 jours d'adaptation aux conditions de logement individuel suivi de 5 jours de collecte des fèces et des urines. De plus, les animaux pourront être utilisés d'une à trois fois, sur des périodes successives de 15 jours (8 jours d'adaptation au régime, 2 jours d'adaptation au logement individuel et 5 jours de collecte) ou à des poids différents. Les porcs retourneront par paire dans l'aire d'adaptation en attendant qu'ils pèsent le poids souhaité lorsque les mesures de digestibilité s'effectueront à des poids vifs très distincts. Cette situation correspond à des conditions d'élevage classiques. En effet, des porcs de 15 kg à 100 kg seront mis en essai afin d'étudier la digestibilité des nutriments en fonction de leurs poids vifs car leurs tubes digestifs s'accroissent tout au long de leur vie, ce qui améliore la digestibilité des nutriments. La récupération de données expérimentales jugées précises ainsi que l'utilisation d'un même porc pour tester plusieurs régimes permet de réduire le nombre d'animaux impliqués dans ce projet. Par ailleurs, les porcs pourront être placés dans des conditions nutritionnelles sub-optimales afin de déterminer leurs besoins. Au maximum, 300 animaux (mâles entiers ou mâles castrés) pourront être utilisés dans ce projet.

L'étude de la digestibilité des nutriments chez le porc consiste donc à analyser les caractéristiques chimiques des aliments ainsi que des urines et des fèces pour déterminer les coefficients d'utilisation digestive (CUD) des nutriments par différence. Il n'existe pas aujourd'hui de méthode in vitro permettant la détermination des CUD chez le porc. Chaque essai sera constitué de 12 porcs, ce qui permettra de comparer deux régimes alimentaires simultanément. En effet, un nombre minimal de 6 porcs est nécessaire pour évaluer la digestibilité d'une matière première, d'un additif ou d'un régime d'intérêt. Ce nombre d'animaux par régime alimentaire a été défini comme étant le nombre minimal pour déterminer des différences statistiques. De plus, au maximum 150 porcs de ce projet pourront subir des prises de sang afin de comprendre l'impact d'un régime sur les paramètres plasmatiques des animaux. En outre, l'aire d'adaptation tout comme les loges individuelles seront enrichies d'une chaîne manipulable et d'une balle suspendue afin d'atténuer le stress éventuel. Les animaux pourront également se voir lorsqu'ils seront logés individuellement. Un suivi journalier sera effectué pour s'assurer du bien-être des animaux.

Trois procédures expérimentales seront mises en place dans le projet. Une première procédure concerne le logement individuel des animaux. La deuxième procédure concerne les prélèvements de sang en complément des mesures de digestibilité. Les prises de sang pourront être effectuées sur un effectif plus réduit d'animaux (au maximum 150 porcs) car la variabilité entre les individus est inférieure pour les paramètres plasmatiques par rapport aux mesures de digestibilité. Enfin, la troisième procédure concerne l'administration per os de produits variés (matière première, composé nutritionnel, additif, ...).

9699 Le cancer du sein « triple négatif » (CSTN) est le sous-type le plus agressif des néoplasies mammaires. Le traitement standard actuel débute par une chimiothérapie néoadjuvante (CTNA) suivie de l'excision chirurgicale. L'identification très précoce des patientes résistantes à la CTNA, ainsi que les mécanismes de résistance, peut permettre une réadaptation thérapeutique et améliorer le pronostic. Dans ce contexte, nous souhaitons évaluer, sur modèles précliniques, l'apoptose potentiellement induite par les chimiothérapies utilisées en situation néoadjuvante. Cette évaluation sera réalisée conjointement par l'évaluation de biomarqueurs tissulaires et l'acquisition d'imagerie moléculaire ciblant l'apoptose.

Notre choix concernant l'imagerie moléculaire, s'est portée sur une petite molécule, la ML-10 marquée au Fluor 18 (18F), dont la biocinétique n'a jamais été rapportée dans le contexte du CSTN. L'accumulation du traceur sera comparée au taux d'apoptose cellulaire mesurée par la méthode conventionnelle. Il permettra d'évaluer la capacité du nouveau radiotraceur 18F-ML-10 pour imager la fraction apoptotique tumorale sur des modèles de cancer du sein humain triple négatif. Deux modèles de cancer du sein humain triple négatif (MDA-MB-468 et MDA-MB-231) implantés en sous cutanée sur des souris femelles de 4 semaines de type NMRI-Nude (Foxn1 nu/ Foxn1nu) seront utilisés pour l'étude du nouveau radiotraceur suite à une injection de monothérapie.

L'objectif de ce projet sera d'évaluer, sur modèles précliniques, l'efficacité thérapeutique, en mesurant la fraction tumorale en apoptose par les méthodes histochimiques et par imagerie moléculaire.

Cette étude sera répartie en deux grandes parties :

(i) Etudes de faisabilités et de mise au point : caractérisation des modèles de xénogreffes des lignées MDA-MB-468 et MDA-MB-231, détermination de la cinétique d'apparition de la fraction apoptotique tumorale après injection d'une monothérapie ou radiothérapie externe et enfin détermination des paramètres d'imagerie du nouveau radiotraceur sur nos modèles : un total de 200 souris sera nécessaire;

(ii) Etude thérapeutique : évaluation de la réponse thérapeutique par imagerie à l'aide de radiotraceur mesurant le métabolisme glucidique et l'apoptose induites par les thérapies. L'imagerie de l'apoptose par traceur radioactif sera comparée à l'analyse des biomarqueurs tissulaires considérés comme méthode de référence. Cette évaluation se fera sur des modèles de xénogreffes de cancer du sein (MDA-MB-468 et MDA-MB-231) traités en monothérapie après une dose unique. Cinq molécules seront évaluées : épirubicine, paclitaxel, TH-302, Nab-paclitaxel et le cisplatine. Pour cela un total de 144 souris sera nécessaire.

Dans le cadre de ce projet, un total de 344 souris femelles âgées de 4 semaines seront nécessaire. Le protocole proposé s'inscrit dans le respect de la règle des 3R (Remplacement, Réduction, Raffinement) pour l'expérimentation animale. En effet, les tests que nous souhaitons développer dans ce projet ne peuvent pas être remplacés par des méthodes alternatives car ils impliquent l'observation des effets de substances pharmacologiques sur la fonction cardiovasculaire chez l'animale.

Le nombre d'animaux est réduit au maximum en sélectionnant uniquement les expérimentations essentielles. Des méthodes de raffinements sont utilisées avec un souci du bien-être animal (condition d'hébergement optimisés, portoirs ventilés, enrichissement de milieu, surveillance quotidienne, anesthésie des animaux). Pour éviter au maximum l'angoisse ou la souffrance des animaux, les procédures seront effectuées sous anesthésie dès que cela sera possible. De plus, une surveillance quotidienne des animaux sera réalisée en surveillant les points limites (Perte de poids, œil clos, diarrhée.). Toute observation d'un de ces points limites conduira à la sortie de l'animal du protocole et à son euthanasie. Cette décision sera prise par le responsable du projet. En cas de douleurs dues au développement tumorale, un traitement anti inflammatoire (ibuprofène 3mg/kg) pourra être ajouté dans l'eau de boisson, sous réserve que celui-ci n'interagisse pas avec le traitement anti tumoral. Cependant nous tenons à préciser que ce phénomène n'a jamais été observé par les différentes équipes ayant eu recours à ce type de modèle.

Au final, ce projet propose de démontrer la place de l'apoptose dans les mécanismes de réponse du CSTN après traitement. Il s'appuie sur l'utilisation intégrée d'outils innovants d'imageries moléculaires et de biomarqueurs tissulaires.

9700 Pour évaluer la sécurité des produits chimiques et ne soumettre à autorisation que des produits dont le profil toxicologique garantit l'absence d'effet néfaste sur la santé humaine, différentes études sont nécessaires. Ces études combinent des modélisations mathématiques par ordinateurs (études *in silico*), des modèles cellulaires (tests *in vitro*) et des modèles animaux (études *in vivo*).

Ce projet a pour objectif de mettre au point des études en toxicocinétique / toxicodynamie (TK/TD) réalisées de manière précoce chez l'animal avant de conduire les études réglementaires plus longues et nécessitant un nombre supérieur d'animaux.

En caractérisant de manière précoce le profil TK/TD d'un produit et ainsi en déterminant précisément s'il peut déclencher un effet toxique sur un ou des tissus candidats, la conduction d'études à plus long terme (et/ou comportant plus d'animaux) seront évitées si les produits testés ont un profil toxicologique défavorable, en accord avec le principe des 3Rs. De même les alertes de toxicité provenant d'études *in silico*, *in vitro*, ainsi que les informations relatives à la chimie ou à l'historique de la famille du produit pourront être confirmées par cette approche.

Toutes ces études se font dans le respect des 3Rs avec un nombre restreint d'animaux. Un total estimé de 1600 rats pourra être utilisés sur 5 années pour ce projet. TK : 20 produits X 5 animaux X 2 doses X 2 sexes = 400 TD : 20 produits X 10 animaux en moyenne X 2 sexes X 3 doses =

1200. 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.

9701 Le cancer de l'estomac est une tumeur maligne qui se développe à partir des cellules des tissus constituant la paroi de l'estomac. C'est un cancer de pronostic intermédiaire dont le taux de mortalité a diminué de moitié sur les 30 dernières années.

Le cancer de l'estomac est au 3^e rang des cancers majeurs à l'échelle mondiale bien que son incidence et sa prévalence aient beaucoup diminué ces dernières décennies en Europe et notamment en France.

Mais l'incidence annuelle des cancers de l'estomac reste élevée dans certains pays d'Asie, d'Europe Centrale et d'Amérique Latine.

Le traitement est d'autant plus efficace s'il est entrepris sur les cancers gastriques en stade précoce (EGC). La dissection sous-muqueuse endoscopique (ESD) est une des techniques de résection de choix pour les EGC.

Néanmoins, les connaissances actuelles sont encore insuffisantes pour décider du traitement chirurgical optimal car il n'existe pas de modalités diagnostiques réellement fiables permettant de prédire le niveau d'invasivité lymphovasculaire des cellules tumorales dans la sous muqueuse gastrique, entre la couche muqueuse et la paroi musculaire.

Les progrès en endoscopie confocale par laser (CLE) permettent d'obtenir en temps réel des images histologiques pendant une chirurgie. Il est ici proposé d'utiliser l'endomicroscope confocal par laser guidé par échographie endoscopique (EUS) pour accéder à la sous muqueuse gastrique et réaliser des prélèvements (biopsies) à l'aide d'un système spécialisé d'aiguille fine. Ceci afin d'obtenir des échantillons qui permettront un diagnostic prédictif de l'étendue d'une tumeur et guider le chirurgien pour définir le périmètre des tissus à retirer.

L'objectif du projet est donc de valider cette approche chirurgicale microinvasive innovante en évaluant sur le modèle porc la faisabilité et l'efficacité (i) de la technique d'endoscopie confocale par laser échoguidée appliquée à la sous muqueuse gastrique et (ii) de la réalisation de biopsies de tissus sous muqueux grâce divers systèmes spécialisés de prélèvement.

6 animaux seront utilisés pour ce projet, dans le respect de la règle des 3R :

Remplacement : Il n'est pas possible de remplacer le modèle *in vivo* pour parvenir à l'objectif scientifique du projet : Les méthodes alternatives *ex vivo* existantes (simulateurs informatique, modèles en silicone de l'anatomie humaine). ne permettent pas la modélisation de procédures chirurgicales complexes de façon réaliste, et ne prennent pas en compte les situations difficiles inhérentes à l'acte interventionnel (hémorragie, nécrose, viabilité des organes, éviter les possibles complications, perforation, utilisation de marqueurs et imagerie fonctionnelle).

Il n'existe à ce jour pas d'alternative au modèle animal pour permettre aux chirurgiens-gastroentérologues endoscopiques de valider de nouvelles approches innovantes à proposer rapidement aux patients.

Réduction : Afin de limiter au maximum les effectifs animaux tout en permettant d'obtenir un nombre suffisant d'essais pour démontrer l'efficacité et la faisabilité de la chirurgie, le nombre d'animaux a été réduit à 6. Il est prévu de réaliser par animal 2 points d'intervention sur chaque compartiment de l'estomac (divisé en 3 parties : haute et basse du corps et antrum), ce qui portera à 36 le nombre de gestes chirurgicaux (abord, dissection, biopsie de la sous muqueuse) réalisés au total dans ce projet.

Raffinement : Les animaux sont hébergés en groupe social dans un environnement enrichi avec paramètres contrôlés (température, hygrométrie, luminosité). Ils sont sédatisés pour les manipulations et toutes les procédures chirurgicales sont réalisées sous anesthésie générale.

Les méthodes utilisées s'appuient sur des technologies innovantes microinvasives (endoscopie, imagerie) mises en œuvre par un chirurgien entraîné.

Les animaux ne sont pas réveillés en fin de chirurgie (euthanasie), et des critères d'arrêt anticipé en cas de survenue d'une complication ont été définis.

9702 Les Entérovirus à tropisme cardiaque, particulièrement les virus Coxsackie B3, sont considérés comme une cause majeure de myocardite virale humaine. Ils sont fréquemment impliqués dans les myocardites aiguës, maladie inflammatoire du myocarde, qui évolue dans 10% des cas en cardiomyopathies dilatées (CMD) seconde cause de transplantation cardiaque dans le monde et également responsable de cas de mort subite cardiaque. À l'heure actuelle, il n'existe aucun traitement spécifique de la CMD et les mécanismes moléculaires impliqués dans l'évolution de la myocardite aiguë en CMD restent à explorer.

L'objectif de ce projet d'étude est d'apporter une meilleure compréhension et l'identification de l'implication de certains récepteurs cellulaires dans la progression de la myocardite aiguë virale à entérovirus en stade chronique et CMD et cela dans le but de développer de nouvelles cibles thérapeutiques contre les infections virales cardiaques.

Dans le but de développer une nouvelle cible thérapeutique contre les infections virales cardiaques, aucune méthode alternative ne peut se substituer à l'utilisation des animaux et la souris est le modèle animal qui sera utilisé dans cette étude, en tenant compte de l'expérience des membres du projet utilisant cette espèce pour les infections virales cardiaque (utilisation du même virus et mêmes doses pour induire la maladie pour être en cohérence avec nos résultats antérieurs) ainsi que les données de la littérature scientifique. Cependant, afin d'atteindre notre objectif et dans le souci de reproduire la myocardite aiguë chez la souris, nous serons amenés à utiliser des doses de virus qui induisent la mortalité (atteinte de points limites).

Pour chaque expérience, nous avons le souci permanent d'utiliser un nombre minimum d'animaux tout en ayant le maximum de chance d'obtenir des résultats satisfaisants, statistiquement significatifs.

Afin de limiter la douleur, les souris seront surveillées et pesées chaque jour, y compris les weekends et les jours fériés, et au premier signe de douleurs les souris seront euthanasiées immédiatement.

Aussi, afin de limiter et de prévenir toute souffrance et l'angoisse des animaux, nous mettrons en œuvre des mesures d'acclimatation de 7 jours après leur arrivés en zone d'hébergement, d'enrichissement des cages notamment avec du coton. Les expériences seront réalisées par le même expérimentateur du début à la fin de la procédure.

Nombre total d'animaux inclus dans ce projet est : 312 sur 5 ans

9703 La sclérose latérale amyotrophique (SLA) ou maladie de Charcot est une maladie neurodégénérative fatale et incurable caractérisée par la perte sélective des neurones moteurs de la moelle épinière et du cerveau. Les neurones moteurs contrôlant l'activité de l'ensemble des muscles volontaires, leur perte conduit irrévocablement à une paralysie générale et à la mort du patient dans les 2 à 5 ans. La SLA se déclare généralement entre 40 et 70 ans avec une incidence de 3-5 pour 100 000 personnes. Certaines lignées de souris montrent les principales caractéristiques de la maladie humaine. L'étude de ces souris nous a permis de mettre en évidence que les neurones moteurs présentent des défauts de régénéscence, reçoivent des quantités moindres de facteurs de survie ou encore présente des défauts dans leur métabolisme. Agir sur ces différents points représente donc une piste thérapeutique qui peut être explorée grâce à l'émergence de nouvelles approches thérapeutiques non-invasives comme la photobiomodulation. En effet, l'exposition répétée de rongeurs à une lumière infra-rouge déterminée par des LED a montré des effets thérapeutiques dans des pathologies du système nerveux en agissant sur la régénéscence, le métabolisme et la production de facteurs de survie. Notre projet consiste à déterminer dans des souris modèles de la SLA l'effet protecteur de la photomodulation

Les souris modèles de la SLA, qui présentent une atrophie musculaire progressive, ne présentent pas de signes de douleur chronique, comme il est également documenté dans les pathologies humaines. Afin de réduire au maximum le nombre d'animaux, la règle des « 3R » est appliquée. La validation fonctionnelle préclinique requiert une expérimentation sur les modèles animaux de la maladie. Nous avons non seulement besoin de réduire le nombre d'animaux impliqués dans les expériences, mais aussi de réduire leur inconfort et douleur. Le raffinement expérimental sera observé avec des installations réservées aux animaux conformes aux réglementations nationales et de l'UE. Cela garantit que le nombre d'animaux est réduit au minimum nécessaire pour le projet

et que les normes de soins des animaux, d'élevage sont maintenues. Nos procédures expérimentales impliquent un suivi rigoureux des animaux afin de réduire toute souffrance, douleur et angoisse aux animaux. Une surveillance régulière est mise en place et nous travaillons étroitement avec la cellule du bien-être animal, avec enrichissement du milieu avec des copeaux dans les litières, igloo, PVC et du coton vierge pour faire un nid végétal.

Nous avons déterminé pour une durée du projet de 1 année, un nombre total de 96 souris.

9704 Les cancers du foie, primitifs (carcinome hépatocellulaire) comme secondaires (métastases hépatiques) représentent un problème majeur de santé publique. Le cancer primitif du foie survient le plus souvent dans des organes endommagés par une hépatite virale, l'alcoolisme ou l'obésité. La prise en charge thérapeutique implique plusieurs stratégies, notamment la greffe hépatique, mais également un traitement local (résection, ablation) et la thérapie focale par agents physiques, principalement par radiofréquence. Cependant, à ce jour, seuls environ 25% des patients sont traités avec une visée curative. Dans le cas des métastases hépatiques, le seul traitement à visée curative est la chirurgie de résection mais la majorité des patients (entre 70 et 80 %) ne sont pas candidats en raison d'un volume hépatique restant insuffisant, d'une localisation tumorale contre-indiquant la résection ou de conditions anesthésiques insuffisantes. Pour réduire la taille des tumeurs, des traitements multimodaux en plusieurs temps ont été développés afin d'épargner le maximum de tissu sain. Dans ce contexte, les traitements focalisés par des agents physiques (Cryothérapie, radiofréquence, micro-onde) ont connu un essor considérable.

A la différence des autres techniques de destruction localisée, l'utilisation d'ultrasons focalisés de haute intensité (HIFU) ne nécessite pas d'introduction de sondes (électrodes ou cryosonde) dans l'organe et est peu dépendante de la perfusion sanguine. De plus, une évaluation post-traitement immédiate est possible au moyen de l'imagerie échographique. Cette technique a déjà démontré son efficacité pour le traitement d'autres pathologies comme par exemple les cancers de prostate, le fibrome utérin ou encore les tremblements essentiels.

Ainsi, un traitement totalement non invasif par ultrasons focalisés des tumeurs hépatiques semble être une approche prometteuse mais nécessite de nombreuses innovations qu'aucune équipe du domaine n'a pu réaliser à ce jour. L'objectif de ce programme de recherche sera dans un premier temps de valider l'utilisation totalement non-invasive d'une sonde HIFU hépatique pouvant traiter la partie du foie qui n'est pas masquée par les côtes. Puis sur la base de ces connaissances de développer une sonde plus complexe alliant l'efficacité thérapeutique qui serait démontrée par ce projet à une utilisation intercostale permettant de cibler l'intégralité de l'organe.

Le but premier de ce projet est d'évaluer la faisabilité de créer des lésions HIFU sur le foie à travers la peau de l'animal en étant reproductible.

L'objectif secondaire est l'évaluation de l'innocuité du traitement.

Ce projet de recherche translationnelle d'une durée maximale de 2 ans mettra en œuvre un maximum de 10 porcs (qui seront réutilisés pour un autre projet). Il est indispensable à ce stade de travailler sur l'animal entier pour évaluer la précision du traitement, son innocuité et les éventuels effets sur les tissus à proximité.

Au cours de la procédure, 10 animaux subiront des expositions HIFU sous anesthésie et sous contrôle échographique. Les animaux seront maintenus anesthésiés pour la réalisation d'un autre projet dont la procédure sera sans réveil. A l'issue de ce second projet, le foie sera prélevé.

Remplacement : Les mises au point des techniques HIFU ont été au préalable effectuées sur tissus ex-vivo après modélisation informatique

Réduction : Les animaux seront réutilisés dans un second projet, les tirs HIFU sur le foie n'interfèrent pas avec celui-ci dont la procédure sera sans réveil.

Raffinement : Le protocole d'anesthésie a été mis au point afin d'éviter toute souffrance. La sonde sera manipulée par des chirurgiens expérimentés.

9705 Les tumeurs du pancréas, ont actuellement pour seul traitement curatif une chirurgie lourde, avec des complications importantes, qui ne peut être proposée à tous les patients en particulier lors d'un stade précoce. Il existe de nouveaux moyens peu invasifs prometteurs pour traiter ce type de lésions mais également peut être pour des stades plus avancés chez les patients non opérables ou en

complément d'une chimiothérapie. Parmi ces nouveaux moyens, les ultrasons focalisés de haute intensité (HIFU) permettent d'obtenir une nécrose précise du tissu visé, sans endommager les tissus traversés par le faisceau et sans aiguille comme c'est le cas en radiofréquence pancréatique. Les HIFU ont été testés avec succès dans le cancer de la prostate, par voie transrectale. Dans ce cas, la voie naturelle endoscopique a été utilisée pour apporter le traitement au plus près des organes afin de proposer une approche non invasive. Pour le cancer du pancréas, cette approche peu invasive est également possible lorsque la lésion est accessible par voie écho-endoscopique transgastrique sans interposition d'air. Une première approche a permis une destruction ciblée de foie de porc in-vivo, validant ainsi la faisabilité du concept. Depuis une sonde écho-endoscopique dédiée dont le foyer de tir peut être déplacé électroniquement permettant des tirs successifs juxtaposés a été développée.

Ce travail a pour but d'évaluer la destruction ciblée d'une région prédéfinie de tissu (hépatique et pancréatique) par HIFU, in-vivo (modèle porcin) sous contrôle écho-endoscopique chez 8 animaux. La nécrose ciblée sera vérifiée par écho-endoscopie pendant le traitement puis histologiquement immédiatement après le traitement.

Objectif principal : évaluer la faisabilité de la nécrose tissulaire induite par les HIFU dans la zone d'intérêt prédéfinie histologiquement.

Objectifs secondaires :

- Evaluer la précision de la destruction par rapport à l'objectif prédéfini
 - Vérifier la tolérance immédiate de la destruction pancréatique
 - Vérifier l'absence de lésion de la paroi digestive située sur le trajet des HIFU en regard de la lésion créée.
 - Etudier la possibilité de suivre les lésions thermiques dans le pancréas par échographie
- Ce projet de recherche translationnelle d'une durée maximale de 3 ans mettra en œuvre un maximum de 8 porcs (réutilisés d'un autre projet de classe modérée). Il est indispensable à ce stade de travailler sur l'animal entier pour évaluer la précision du traitement, son innocuité et les éventuels effets sur les tissus à proximité.

Au cours de la procédure, 8 animaux subiront des expositions HIFU sur le foie et le pancréas par voie endoscopique sous anesthésie générale et seront euthanasiés puis autopsiés.

Remplacement : Les mises au point des techniques HIFU ont été au préalable effectuées sur tissus ex-vivo après modélisation informatique.

Réduction : Les animaux seront réutilisés d'un précédent projet (classe modérée), les tirs HIFU n'interfèrent pas avec celui-ci et la procédure sera sans réveil.

Raffinement : Le protocole d'anesthésie a été mis au point afin d'éviter toute souffrance. La sonde sera manipulée par des chirurgiens expérimentés.

9706 Le syndrome d'apnées-hypopnées obstructives du sommeil (SAHOS) se caractérise par la survenue, pendant le sommeil, d'épisodes anormalement fréquents d'interruptions de la ventilation (apnées), ou de réductions significatives de la ventilation (hypopnées). Il est lié à un collapsus répété des voies aériennes supérieures au cours du sommeil. Les épisodes d'apnées et d'hypopnées entraînent une diminution de l'oxygène dans le sang et des micro-éveils.

Les conséquences du SAHOS sont nombreuses pour le patient. Elles s'expriment sur le court-terme et sur le long-terme.

Les manifestations sur le court-terme sont les suivantes : somnolence diurne, baisse de vigilance, difficulté à conduire (risques d'accidents de la route), difficulté à exécuter des tâches (risques d'accidents du travail), problèmes de mémoire et de concentration, difficultés d'apprentissage (particulièrement chez les enfants), troubles de l'humeur. Au final, il y a une altération de la qualité de vie du patient.

Le SAHOS entraîne également des conséquences sur le long-terme : un lien entre SAHOS et morbi-mortalité cardiovasculaire a été exploré par plusieurs études de cohorte.

La ventilation nasale par pression positive continue (PPC) est considérée comme le traitement de référence du SAHOS. Près de 490 000 patients ont bénéficié d'une PPC en 2012 en France (doublement du nombre de patients traités depuis 2006). A ce jour un nombre important de patients

arrêtent le traitement par PPC en raison de l'inconfort du système actuel et du bruit généré par les turbines et le masque de respiration.

Ce projet vise à finaliser le développement d'un traitement non invasif de l'apnée du sommeil à base d'ondes acoustiques basses fréquences. Ce traitement repose sur la réalisation d'un dispositif en rupture totale avec les dispositifs actuellement commercialisés.

L'objectif est d'améliorer le confort du traitement en remplaçant le masque de réparation par un collier vibrant, réduisant ainsi l'inconfort au niveau de la bouche et le nez, et supprimant le bruit. Il est nécessaire de tester et de valider tout nouveau dispositif médical sur l'animal avant de pouvoir le tester chez l'homme

Les résultats attendus sont de :

- Valider un nouveau dispositif de traitement du SAHOS avec des vibrations basses fréquences, permettant ainsi de lever l'obstruction de voies aériennes supérieures et d'augmenter le débit respiratoire.
- Eliminer l'inconfort des dispositifs actuels, augmentant ainsi le nombre de patients éligibles à un traitement.
- Réduire l'impact économique de ces traitements

Une première étude a permis de valider l'efficacité du dispositif et il est maintenant nécessaire d'investiguer les mécanismes d'action précis du système afin d'optimiser son fonctionnement.

Pour ce faire, les porcs seront anesthésiés de façon légère, monitorés et placés sur le dos de manière à provoquer un SAHOS. Des paramètres tels que l'électroencéphalogramme, la réponse nerveuse ou les contractions des muscles (langue, diaphragme) seront étudiés au cours du traitement. Ceci sera répétés 5 fois à raison d'une fois par semaine.

Ce projet utilise le modèle animal porcin et huit porcs maximum seront utilisés afin d'atteindre les objectifs fixés.

Ce nombre d'animaux a été réduit au maximum sans compromettre l'interprétation des résultats. La faible invasivité de la procédure, une surveillance adaptée des animaux et une définition précise des points limites permettent une classification des procédures expérimentales en classe modérée.

9707 L'artériopathie oblitérante des membres inférieurs (AOMI) est une des causes principales de mortalité, avec une prévalence de 10% entre 65-69 ans. L'ischémie critique des membres inférieurs (ICMI), stade ultime de l'AOMI, nécessite une chirurgie de revascularisation et, en cas, d'échec, une amputation du membre.

Aujourd'hui, 3 approches thérapeutiques de revascularisation sont proposées aux patients présentant une ICMI à haut risque d'amputation :

- la thérapie génique reste controversée.
- la thérapie cellulaire favorise la formation de nouveaux vaisseaux secondairement à l'implantation intramusculaire (IM) dans le mollet ischémié de cellules humaines d'origine autologue issues de la moelle osseuse. Les résultats des essais cliniques nationaux et internationaux chez l'homme sont mitigés du fait de l'hétérogénéité des produits de thérapie cellulaire (PTC) et du nombre limité de patients. Cependant la thérapie cellulaire reste une option contre l'amputation.
- la thérapie protéique consiste à injecter en IM des facteurs de croissance (VEGF, HGF, FGF) favorisant la formation de nouveaux vaisseaux. Les essais cliniques ont été décevants et cette stratégie a été abandonnée (concentration insuffisante, dégradation rapide des protéines...).

Avant les premiers essais chez l'homme, des modèles animaux d'ischémie du membre inférieur avaient été décrits dans la littérature, mimant l'ICMI. Il est donc nécessaire aujourd'hui de revenir à l'expérimentation animale afin de définir les protocoles thérapeutiques de demain.

Le mode d'administration des facteurs de croissance s'avère crucial pour optimiser leur action in vivo et limiter leur dégradation dans le temps. Plusieurs systèmes de protection des protéines ont été développés, comme les microparticules. Ces microparticules biocompatibles sont capables de libérer localement de façon prolongée (LP) une association de facteurs de croissance (FGF2 et HGF). Ces microparticules à LP injectées localement ont déjà démontré leur intérêt pour stimuler la néovascularisation dans un modèle d'infarctus du myocarde chez le rat.

Nous formulons l'hypothèse qu'un effet similaire sera observé dans un modèle murin d'ischémie du membre inférieur mimant l'ICMI lorsque les mêmes microparticules seront injectées en IM dans le mollet ischémié de rat.

Après une étude préliminaire sur 30 rats (15 Lewis et 15 Nude), le projet comprend 2 étapes :

- 1ère étape : Optimisation de la thérapie protéique à LP. Le véhicule seul, les microparticules vides, les microparticules contenant 1 ou les 2 facteurs de croissance (FGF2 et HGF) à 3 doses différentes croissantes sont injectées en IM dans le mollet ischémié de rat Lewis 5h après la ligature de l'artère fémorale. Les rats seront randomisés en 11 groupes (avec 7 rats par condition), soit un total de 77 rats de souche Lewis.

- 2ème étape : Association thérapie protéique à LP et thérapie cellulaire : comparaison d'efficacité entre les 2 thérapies, synergie d'action ? Le véhicule seul, les microparticules vides, les microparticules (HGF et/ou FGF2 à la dose optimale choisie lors de la 1ère étape) associées ou non à des 7 PTC humains différents sont injectées en IM dans le mollet ischémié de rat Nude 5h après la ligature de l'artère fémorale. Les rats seront randomisés en 17 groupes (avec 7 rats par condition), soit un total de 119 rats de souche Nude. Ces rats, à réaction immunitaire réduite, sont nécessaires pour la tolérance d'un matériel d'une autre espèce. Nous utiliserons un nombre maximal de 226 rats.

Des tests comportementaux (« Rat Grimace Scale » et « Tarlov Score ») nous permettront d'évaluer la douleur et le degré d'ischémie. Des tests fonctionnels de mesure du périmètre de marche et des analyses du flux sanguin par LASCA (Laser Speckle Contrast Analysis) nous permettront de suivre l'efficacité clinique de l'approche thérapeutique de revascularisation. Ces tests sont programmés avant la chirurgie (mesures de base) et à J1, J3, J7, J13, J21 et J28 post-ischémie. Ces tests effectués longitudinalement permettent de réduire le nombre d'animaux nécessaires à l'étude. Les rats seront euthanasiés au 28ème jour postopératoire. L'étude préliminaire permettra d'étudier le rétablissement du flux sanguin. S'il est insuffisant, le protocole sera poursuivi jusqu'au 40ème jour. Des analyses histologiques, transcriptomiques et protéomiques seront effectuées sur les biopsies musculaires des 2 membres inférieurs

Ce modèle d'étude d'ischémie aiguë du membre inférieur ne peut être remplacé par un modèle in vitro car il fait intervenir des interactions complexes entre le matériel cellulaire administré et les tissus biologiques vivants (muscle, vaisseaux, facteurs environnementaux, physiques ou biologiques). Les cellules humaines injectées ont fait d'objet d'un dépistage des maladies humaines transmissibles et ont été manipulées sous atmosphère stérile. Les microparticules préparées stérilement sont biocompatibles, non immunogènes et ont été bien tolérées en intracardiaque chez le rat. L'ischémie aiguë peut conduire à une auto-amputation de l'animal mais le plus souvent la régénération vasculaire est très rapide chez le rongeur. Nous effectuerons tous les gestes chirurgicaux sous anesthésie générale et la prise en charge de la douleur sera poursuivie par administration de Buprénorphine. Les animaux seront sous surveillance rapprochée pendant l'hébergement (mesure du poids, apparence physique, comportement). Nous prévoyons un enrichissement des cages durant l'hébergement.

Les points limite de cette étude sont une perte de poids supérieure ou égale à 20% ou un score « Rat Grimace Scale » supérieur ou égale à 2 ou une auto-amputation. L'administration de Buprénorphine sera réévaluée pendant l'étude préliminaire et en fonction des résultats des tests « Rat Grimace Scale ». Les animaux présentant un score aux tests supérieur ou égale à 2 (« sévère ») auront une dose d'analgésique majorée. Si le score sévère persiste, l'animal sera euthanasié.

9708 Les études prospectives montrent que l'augmentation combinée de la population mondiale et du niveau de vie dans les pays émergents va rapidement et largement accroître la demande en protéines alimentaires. Cette demande ne pourra pas être complètement satisfaite, de façon durable, par une augmentation des productions animales. Il est donc urgent de trouver des sources alternatives de protéines pour l'alimentation humaine. Les tourteaux issus de la production d'huile de colza, constituent une source de protéines importante, actuellement consommée par les animaux d'élevage. L'utilisation des protéines de colza dans les aliments pour l'homme est inexistante, mais les choses pourraient rapidement changer suite à la récente décision de la

commission européenne autorisant la mise sur le marché des protéines de graines de colza en tant que nouvel ingrédient alimentaire.

L'objectif du projet est de comparer l'effet du mode de production des tourteaux de colza, et des procédés d'extraction/purification des protéines, sur les qualités technologiques (solubilité, propriétés émulsifiantes ...), nutritionnelles (AA, digestibilité, vitesse de digestion, potentialité à libérer des peptides bioactifs), et sanitaires (allergénicité, facteurs antinutritionnels, résidus d'extraction ...) des fractions obtenues. Ceci permettra d'adapter la production industrielle des tourteaux, et d'identifier les procédés de production d'isolats de protéines les mieux adaptés, afin de produire des fractions protéiques optimisées pour une utilisation en nutrition humaine en tant qu'ingrédient protéique de qualité, pouvant rivaliser avec les fractions protéiques d'origine animale. A l'issue du projet, nous disposerons d'une caractérisation très précise des différentes fractions protéiques, qui permettra de les positionner très clairement sur le marché des ingrédients protéiques.

Le protocole objet de la saisine a pour but de caractériser la qualité nutritionnelle des fractions protéiques de colza issues d'un tourteau R&D, garantissant des conditions d'extraction plus douces (chauffage très limité) que celle utilisées actuellement par l'industrie, et pour lequel l'extractibilité des protéines s'est révélée supérieure à celle d'un tourteau industriel. Différents procédés d'extraction/fractionnement des protéines sont appliqués, conduisant à 2 sous-fractions, l'une contenant majoritairement les globulines 11-12S (fraction 'cruciférine') et l'autre les albumines 2S (fraction 'Napine'). 2 voies d'extraction/purification ont été sélectionnées. La première repose sur une extraction des protéines totales à pH neutre puis d'un fractionnement par précipitation acide des cruciférines et purification des napines solubles par ultrafiltration/diafiltration (UF/DF). La deuxième repose sur une extraction acide des napines et leur purification par UF/DF. Une étude préliminaire in vitro ayant mis en évidence une très faible sensibilité des napines à la digestion par les enzymes digestives, un procédé permettant d'accroître cette digestibilité sera également testé. L'index de référence pour mesurer la qualité nutritionnelle d'une protéine alimentaire est le DIAAS (pour 'Digestible Indispensable Amino Acid Score') proposé par la FAO (2013). Il repose sur la composition en acides aminés indispensables (AAI) de la protéine, par rapport à celle d'une protéine de référence permettant de couvrir les besoins de l'homme pour chacun des AAI, et la biodisponibilité de chacun des AAI. La biodisponibilité des acides aminés composant les protéines alimentaires est généralement évaluée par une mesure de la quantité d'acides aminés absorbés avant la fin de l'intestin grêle (digestibilité iléale réelle). Au-delà de la composition en AAI, cette mesure de digestibilité est indispensable pour pouvoir classer les protéines alimentaires les unes par rapport aux autres, et ajuster les apports alimentaires aux besoins. Un autre critère qui peut être intéressant à considérer, notamment pour la nutrition de populations spécifiques telles que les personnes âgées, est la vitesse de digestion des protéines. En effet il a été clairement démontré que la vitesse de digestion d'une protéine peut très significativement affecter l'utilisation métabolique des acides aminés qui la composent. Outre leur potentialité à couvrir les besoins en AAI, les protéines de colza pourraient également présenter des effets bénéfiques sur la santé par la libération de peptides possédant des propriétés biologiques particulière. Des données de la littérature suggèrent notamment des propriétés antihypertensives. Le présent projet adressera ces 3 volets de la qualité des protéines alimentaires : digestibilité, vitesse de digestion, potentialité à libérer des peptides bioactifs.

Le projet répond à la règle des 3R. Il n'existe pas de méthode in vitro validée par la communauté scientifique internationale pour prédire la digestibilité des protéines alimentaires dans l'intestin grêle de l'homme (impossible de Remplacer). Celle-ci étant très difficile à mesurer directement chez l'homme, le recours au modèle animal porcin (le plus prêt de l'homme en terme de physiologie digestive) est la meilleure alternative (FAO 2013). Au maximum, 8 miniporcs seront utilisés dans le projet. L'effectif à inclure dans l'étude (n=6) été calculé pour obtenir une précision de +/- 0,5% sur la valeur de digestibilité mesurée. La méthodologie utilisée pour mesurer cette digestibilité est totalement maîtrisée par les investigateurs qui possèdent une expertise reconnue dans le domaine (Raffiner). Les 6 animaux recevront successivement, dans un ordre aléatoire, les 4 fractions protéiques à tester, ce qui permet de limiter le nombre d'animaux utilisés (Réduire). Le potentiel antihypertensif des fractions protéiques de colza sera testé sur des rats spontanément hypertendus

(rats SHR). L'approche in vivo est la seule à pouvoir intégrer les processus digestifs, leur régulation, le métabolisme de la paroi intestinale et la réponse vasculaire (impossible de Remplacer). Les mesures de pression sanguine sont non invasives mais nécessitent le gavage de l'animal avec les fractions protéiques à tester et une contention de l'animal pendant la période postprandiale. Le stress potentiel lié à ces manipulations sera limité au maximum par des manipulateurs expérimentés (Raffiné). Au maximum, 16 rats seront utilisés dans le projet. Un dispositif expérimental en double carré latin permet de limiter à 12 le nombre de rats à inclure dans le protocole. Cet effectif minimum est basé sur la variabilité des mesures observées dans la littérature (Réduire).

9709 La photophobie ou aversion à la lumière est définie comme une sensibilité anormale aux faibles niveaux de lumière pouvant déclencher des douleurs oculaires et des maux de tête. Ainsi, les patients souffrant d'une photophobie sévère ne peuvent pas supporter aucun type de lumière, ce qui conditionne leur qualité de vie professionnelle et personnelle. La photophobie est présente dans une large gamme de troubles ophtalmiques et neurologiques, parmi lesquels se trouvent la conjonctivite, l'inflammation oculaire, les traumatismes cérébraux, et les céphalées. Elle est liée aussi à des conditions génétiques comme l'albinisme, à l'utilisation quotidienne des lentilles de contact et même lors de l'exposition à certains médicaments. De même nombreuses personnes, inclus les aveugles, éprouvent une sensibilité à la lumière en l'absence de pathologie oculaire. Mais c'est notamment dans le cadre de la migraine qu'on trouve l'incidence la plus importante, car la photophobie est le principal symptôme qui accompagne les crises migraineuses dans plus de 90% des patients. La migraine, considérée l'affection neurologique la plus fréquente et la 6ème cause de handicap dans le monde, est caractérisée par des maux de tête et des nausées pouvant durer de 4 à 72 heures en l'absence de traitement. Elle touche environ 12-15% de la population, préférentiellement les femmes (18% par rapport à une incidence de 6% chez les hommes).

A ce jour il n'y a pas de thérapie spécifique de la photophobie. Sa prise en charge repose principalement sur des traitements étiologiques de la migraine ou des stratégies d'évitement. En effet, les patients migraineux ont des seuils de photosensibilité inférieurs aux sujets sains, aussi bien pendant qu'entre les crises de migraine. Cela conduit généralement les malades à s'isoler, loin de leur travail, de leur famille et de leurs activités quotidiennes, et à privilégier l'ombre à la lumière. L'absence d'un traitement ajusté est probablement due à une connaissance insuffisante des mécanismes neurobiologiques par lesquels la lumière induit et/ou aggrave les céphalées. Ainsi, le développement de modèles animaux de photophobie avec une bonne validité prédictive permettant la compréhension des circuits neuronaux sous-tendant la photophobie représente un enjeu majeur pour la découverte des cibles thérapeutiques visant à prévenir l'apparition de ce symptôme.

Les objectifs de ce projet, d'une durée maximale de 3 ans, sont les suivants :

- 1) Développer un nouveau modèle prédictif de migraine chez la souris.
- 2) Concevoir et mettre en place des tests comportementaux capables de mesurer la sensibilité à la lumière chez le rongeur migraineux.
- 3) Identifier les régions du cerveau impliquées dans la photophobie associée à la migraine et étudier leur activité neuronale.
- 4) Évaluer la fonctionnalité de la rétine (organe visuel destiné à recevoir les impressions lumineuses) chez des souris atteintes de photophobie.

Ce projet s'établit en conformité avec les exigences éthiques de remplacement, de réduction et de raffinement (règle des 3R). Tandis que nous faisons une étude éthologique sur le comportement de l'animal, il n'est pas possible de remplacer l'utilisation de souris par des méthodes alternatives. Cependant, nous utiliserons un nombre réduit d'animaux (maximum de 10 souris par group, soit 1060 en total pour 3 ans) tout en gardant la significativité des résultats via une analyse statistique adaptée (le nombre d'animaux est fixé grâce à une étude statistique préalable réalisé dans notre laboratoire). Les conditions d'hébergement des animaux seront adaptées à leurs besoins physiologiques et leur bien-être, qui sera évalué quotidiennement par le personnel en charge. Ils auront une période d'adaptation à l'expérimentateur et aux conditions de stabulation avant de débiter l'étude comportementale. Des points limites seront mis en place pour toujours préserver l'état physique et le confort des animaux. En plus, les tests comportementaux prévus pour mesurer

la sensibilité à la lumière sont de tests non invasifs, fondés sur l'envie naturelle d'explorer du rongeur.

9710 Le but de notre équipe est de caractériser des modèles animaux de maladies musculaires humaines (myopathies et dystrophies) et de tester l'éventuelle amélioration des signes de la maladie grâce à différentes approches thérapeutiques. Notre travail est principalement axé sur les maladies génétiques affectant les muscles. Pour comprendre comment les mutations génétiques sont responsables de ces pathologies, nous avons dans un premier temps utilisé des modèles cellulaires. Nous prévoyons maintenant d'utiliser des souris mimant la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) pour mieux comprendre les mécanismes responsables de la pathologie dans ce modèle vivant.

Nous avons précédemment montré qu'un niveau trop élevé de la dynamine 2 dans le muscle semblait jouer un rôle majeur dans la survenue de certaines myopathies. Nous avons développé deux approches utilisant d'une part un croisement génétique dans le but de diminuer l'expression de dynamine 2 de 50% et d'autre part une approche thérapeutique utilisant un composé injectable capable aussi de diminuer le niveau de dynamine 2. Chez des souris malades exprimant 50% de dynamine 2 ou injectées avec le composé, nous avons obtenu leur rétablissement quasi-total sur l'ensemble des signes cliniques de la maladie, et l'allongement de leur durée de vie. Notre but est maintenant d'appliquer cette approche thérapeutique à d'autres maladies musculaires (dystrophies), plus particulièrement à la dystrophie musculaire de Duchenne.

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est la plus fréquente des maladies musculaires chez les enfants. La DMD est une maladie ne touchant que les garçons avec une atrophie et une faiblesse musculaire progressive, affectant presque tous les muscles, et qui résulte normalement d'une mort prématurée à cause de défauts cardio-respiratoires. Malgré des recherches approfondies sur les thérapies pour la DMD ciblant l'expression de la dystrophine, aucun traitement effectif n'a encore été développé pour cette maladie.

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 par jour) seront réalisées chez les mêmes souris, pour réduire le nombre total de souris (REDUCTION). 15 souris/groupe pour la lignée 1 et 7 souris/groupe pour la lignée 2 seront utilisées pour garantir une bonne puissance statistique, et par là, garantir la validité scientifique de l'étude. Ainsi, un maximum de 1082 souris sera utilisé. 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).

9711 Depuis le développement « épidémique » de l'obésité et des comorbidités, des études ont été menées afin d'identifier et/ou de développer des stratégies visant à prévenir la survenue de ces désordres physiopathologiques. Les recommandations portant sur l'alimentation et notamment la consommation de fruits et légumes ont eu un impact bénéfique sur l'obésité et ses complications, attribué en partie à certains micronutriments. Parmi eux, les caroténoïdes semblent être particulièrement intéressants vis-à-vis des problématiques liées à l'obésité. De nombreuses études associent ainsi les plasmatiques de ces micronutriments à la diminution de la prévalence de l'obésité et des désordres physiopathologiques consécutifs dont l'insulino-résistance et les maladies cardiovasculaires.

Des effets préventifs d'un extrait de tomate vis-à-vis du développement de l'obésité ont été mis en évidence précédemment, et ont été attribués en partie à sa richesse en lycopène, caroténoïde majeur de la tomate. Toutefois, la tomate et des produits dérivés sont également riches en phytoène et phytofluène, précurseurs de la biosynthèse des caroténoïdes, dont les effets biologiques ont été peu étudiés jusqu'à présent.

Dans ce projet, nous étudierons donc la capacité du phytofluène et phytoène à prévenir le développement de l'obésité dans un modèle murin d'obésité induite par l'alimentation. Des souris

(C57Bl6J) seront nourries pendant 10 semaines avec soit un régime riche en lipides soit un régime riche en lipides supplémenté avec une dose équivalente de phytofluène ou de phytoène ou de lycopène (contrôle positif). Un groupe recevant un régime à teneur normale en lipides (régime d'entretien AIN-93M, 10% de l'énergie apportée) servira de groupe contrôle normopondéral.

Le nombre total d'animaux nécessaires sera de 50.

Afin de mettre en évidence le développement de l'obésité et de ses conséquences métaboliques, une combinaison de mesures est prévue :

- pesée hebdomadaire et mesure de la consommation alimentaire ;
- prélèvements sanguins afin de mesurer l'évolution de la glycémie et de l'insuline plasmatique ;
- collection de fèces en début puis au cours du protocole pour caractériser le microbiote et mettre en évidence d'éventuelles modifications en fonction du régime ;
- mesure de la réponse glycémique en réponse à l'insuline pour mettre en évidence un dysfonctionnement de la réponse à l'insuline.

A l'issue des études, les animaux seront euthanasiés sous anesthésie générale pour prélèvement d'organes afin de caractériser les effets biologiques dans différents tissus.

Cette étude prendra en compte la règle des 3 Rs :

Remplacement : il n'existe à l'heure actuelle aucune méthode de substitution in vitro pour étudier l'impact de compléments alimentaires sur la prévention de l'obésité. La souris est un modèle de choix car elle présente des mécanismes physiologiques proches de ceux qui sont observés chez l'être humain.

Réduction : le nombre d'animaux est le minimum nécessaire pour mettre en évidence des différences statistiquement significatives entre les groupes.

Raffinement : les méthodes utilisées sont en majorité non invasives. Les animaux seront hébergés par groupe de 3 à 4 individus et l'environnement sera enrichi par la présence d'un igloo en plastique et de nid végétal.

9712 Aigue, la douleur est physiologique, nécessaire à la survie. Chronique ou persistante, par 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 ne sont souvent que partiellement efficaces et peuvent s'accompagner d'effets secondaires importants. Il faut découvrir de nouveaux médicaments et donc disséquer les mécanismes responsables des douleurs chroniques.

Or si notre connaissance des mécanismes de la douleur s'est considérablement accrue, elle ne s'est accompagnée d'aucune avancée thérapeutique majeure. Une des raisons à cet échec est qu'il n'existe pas une mais des douleurs. En effet, inflammatoires ou neuropathiques, les douleurs chroniques se manifestent par des douleurs spontanées et/ou douleurs provoquées par une stimulation normalement douloureuse (exagération de la douleur ou hyperalgésie) ou non (allodynie). Chaque symptôme douloureux dépend de mécanismes distincts et nécessite donc un traitement spécifique.

L'allodynie mécanique est très fréquente chez les patients douloureux chroniques, observée chez 20-50% des patients neuropathiques et 60-80% des migraineux chroniques. Il est maintenant clair que l'apparition d'une allodynie mécanique est liée à l'activation, dans la corne dorsale (CD) de la moelle épinière ou le sous-noyau caudal du trijumeau (Sp5C), homologue trigéminal de CD, d'un circuit neuronal polysynaptique. Sous contrôle de l'inhibition synaptique, le circuit allodynique est inactif en conditions physiologiques; il ne devient actif qu'en conditions pathologiques, lorsque l'inhibition est levée. L'information tactile accède alors aux voies nociceptives et déclenche une douleur. Or les mécanismes responsables de cette activation restent encore largement méconnus.

La cyclin-dépendent kinase 5 (Cdk5) est une kinase sérine/thréonine présente dans le système nerveux où elle contribue à de nombreux processus physiologiques et pathologiques, dont la douleur. Ainsi, l'inactivation de p-35 (souris KO), un activateur de Cdk5, produit une hypoalgésie généralisée, thermique et mécanique, et sa potentialisation (souris transgéniques) déclenche inversement une hyperalgésie. On a montré qu'une telle hypersensibilité douloureuse résulte de l'activation de Cdk5 aussi bien dans le 1er neurone que le néocortex, suggérant que la Cdk5 facilite la transmission du message douloureux tout au long des voies nociceptives. L'activation de la Cdk5

contribue-t-elle aussi à l'activation du circuit allodymique dans le Sp5C ? Inhiber la Cdk5 pourrait se révéler une stratégie thérapeutique contre l'allodynie mécanique.

Pour appliquer la règle des 3R, le nombre d'animaux est réduit au maximum, tenant compte des animaux qui ne répondraient pas aux tests mais suffisant pour discriminer un effet statistiquement significatif entre traitements (analyse de variance et tests post-hoc paramétriques ou non paramétriques). Au total, 175 rats seront utilisés, avec mise à mort après la fin des procédures par overdose anesthésique.

Toutes les injections (sous-cutanées, intracisternales) seront pratiquées sous anesthésie. Il ne sera pas possible de réduire la douleur infligée par l'injection de substance inflammatoire dans la lèvre supérieure puisqu'on désire justement mesurer le comportement douloureux. Cependant, tout sera fait pour réduire l'anxiété des animaux due au nouvel environnement (hébergement dans des cages à environnement enrichi dans notre animalerie pendant une semaine avant toute intervention) et à l'expérimentateur (habituation pendant 4 jours avant intervention).

L'intégration de la douleur implique de nombreuses régions du système nerveux centrale et périphérique. Aucune méthodes alternatives ne permettent de remplacer ce protocole à l'heure actuelle.

9713 Des procédures chirurgicales sont régulièrement utilisées dans le cadre d'études d'efficacité ou de toxicologie. La réalisation d'expériences chez l'animal dans le cadre du développement non-clinique est incontournable afin d'évaluer l'activité des produits dans des organismes complets et complexes (pas de Remplacement possible). Nous appliquons donc cette stratégie après avoir réalisé au préalable les tests in vitro ayant permis de limiter le nombre d'animaux à utiliser in fine (Réduction du nombre d'animaux, tout en gardant un nombre permettant une exploitation statistique des résultats).

Dans tous les cas, les procédures seront réalisées sous anesthésie générale selon des techniques précisées pour chaque espèce animale concernée, associée à l'usage d'analgésiques (Raffinement des procédures).

Le but de cette demande est de décrire une procédure chirurgicale consistant à insérer un cathéter intraveineux dans la veine jugulaire (au niveau du cou) d'un animal anesthésié (rat ou souris), afin d'avoir une voie veineuse utilisable pour des perfusions pendant plusieurs jours. Ces perfusions permettront d'injecter une substance-test afin de réaliser des études de toxicologie ou d'efficacité. Groupes de 10 rats ou souris. 2 à 3 groupes d'animaux par étude. 3 à 5 études par an. Total de 1500 animaux en 5 ans.

9714 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 souhaitons comprendre le rôle de deux protéines impliquées dans des dystrophies musculaires. Pour cela, nous allons utiliser une procédure correspondant à une activation de ces protéines par un mécanisme d'hypertrophie du muscle. L'hypertrophie sera induite par un étirement obtenu par dénervation unilatérale du diaphragme. Cette technique permet d'obtenir une condition où le muscle subit un étirement cyclique en raison des mouvements liés à la respiration, ce qui induit une hypertrophie initiale transitoire. Cette condition expérimentale ne peut être réalisée que sur le diaphragme, muscle principal impliqué dans la respiration. En démontrant l'implication des protéines d'intérêt dans ce phénomène d'hypertrophie, les résultats obtenus par cette technique nous permettront de définir des conditions qui serviront ensuite à l'évaluation de l'efficacité de traitements thérapeutiques.

Remplacement : La dénervation ne peut pas être faite sur des cellules. Cette technique est une technique utilisant la respiration naturelle comme moyen d'induire un étirement cyclique qui conduit

à une hypertrophie et ce, de façon indépendante de l'innervation. Cette technique doit donc être faite sur l'animal. Le critère de remplacement n'est pas applicable pour cette étude.

Réduction : cette technique correspond à un geste technique très spécifique et sa maîtrise est essentielle afin d'éviter des accidents chirurgicaux entraînant une mort prématurée des animaux. Afin de réduire le risque d'accidents, nous avons entrepris l'apprentissage de la technique sur des animaux prévus pour être réformés dans une demande d'autorisation préalable. Ceci devrait donc nous permettre de réduire le nombre d'animaux à inclure dans les protocoles de ce projet. Les contrôles WT seront mutualisés entre les modèles ayant le même fond génétique

Raffinement. Le bien-être animal sera assuré par de bonnes conditions d'hébergement selon la réglementation en vigueur avec un enrichissement du milieu, un suivi régulier des animaux, l'instauration de points limites pertinents et la mise en place de mesures adaptées, notamment la gestion de la douleur que les animaux pourraient ressentir. Aucune procédure particulière de raffinement n'est à rajouter pour les modèles utilisés par rapport à des animaux sauvages en raison d'un phénotype non dommageable.

Dans cette procédure, les animaux en protocole seront sous anesthésie (isoflurane puis un mélange de kétamine et xylazine) et sous analgésique (Buprénorphine). Des points limites sont définis et seront appliqués pendant la phase post-opératoire. Si le niveau le plus élevé est atteint, les animaux seront euthanasiés. De plus, un aliment spécifique hydratant et nourrissant sera placé au sol dans la cage afin d'en faciliter l'accès aux souris.

Nous estimons que 110 souris seront utilisées. 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 dans le but d'obtenir les résultats les plus robustes en impliquant le moins d'animaux possible.

9715 Dans un contexte où différentes transitions alimentaires touchent ou vont toucher les populations des pays émergents et développés, promouvoir une alimentation saine et durable constitue un objectif primordial pour assurer à la fois la santé publique et un développement agro-alimentaire durable. Ces transitions nutritionnelles recouvrent des changements de l'apport glucido-lipidique qu'on sait impliqués dans les dérégulations métaboliques associées au risque cardiométabolique, et impliquent des changements des teneurs et sources de protéines animales et végétales dont on connaît mal les répercussions métaboliques. Par rapport aux protéines animales (PA), les protéines végétales (PV) sont considérées comme de moindre qualité en termes de satisfaction des besoins protéiques, du fait de leurs plus faibles digestibilités et de leurs moindres teneurs en acides aminés indispensables. Néanmoins, on méconnaît les réorientations métaboliques qui seront induites par l'augmentation attendue de la part des PV dans l'alimentation, et qui pourraient se révéler favorable en termes de prévention des dérives cardiométaboliques.

Ce projet vise à mieux connaître l'impact d'une augmentation de la part des PV dans un contexte de régime de type occidental sur les réorientations métaboliques et les dérives cardiométaboliques. Ceci nécessite d'accéder à une connaissance intégrée des réorientations métaboliques induites par une telle substitution protéique, qui relèvent d'une flexibilité métabolique adaptative et qui peuvent s'avérer neutres, protectrices ou aggravantes vis-à-vis de l'initiation des dérives cardiométaboliques. L'acquisition de données omiques (dites à haut-débit) concernant ces réorientations métaboliques, associée à leur analyse par modélisation, devrait permettre d'en dégager une connaissance intégrée et d'identifier des biomarqueurs des adaptations ou dérives métaboliques induites, utilisables chez l'homme dans des cohortes ou des études d'intervention visant à analyser les effets de telles transitions nutritionnelles.

Les animaux utilisés seront des mini-porc Yucatan mâles appareillés de 4 cathéters (artériel, portal, sus hépatique et cave inférieure). 20 animaux : 10 animaux /type de protéine seront utilisés. Les animaux seront alimentés avec 4 régimes différents en suivant un schéma parallèle : pour chaque type de protéine (animal ou végétale) d'abord consommation d'un régime normal (2 semaines), puis obésogène (8 semaines).

Des prélèvements sanguins sont prévus en début (T0), milieu (T0.5, T1) et fin de protocole (T2). Des biopsies de divers organes seront également collectées à T0 et T0.5 et T2.

Le protocole proposé s'inscrit dans le respect de la règle des 3R (Remplacement, Réduction, Raffinement) pour l'expérimentation animale, réduisant au minimum le nombre d'animaux nécessaires pour la réalisation du projet. En effet, les animaux (20) sont utilisés pour transiter sur 4 groupes dans un schéma expérimental longitudinal, où les mêmes individus sont utilisés comme leurs propres témoins en passant sur deux conditions expérimentales successives. Par ailleurs, les protocoles appliqués au projet sont adaptés aux interventions chirurgicales (pose de cathéter et biopsie), avec une anesthésie générale et des traitements locaux visant à réduire l'impact des gestes invasifs.

9716 La douleur est un processus physiologique nécessaire à la survie : elle prévient l'organisme d'un danger imminent et permet la mise en œuvre de réponses adaptées qui visent à en limiter les effets délétères. Cependant, lorsque la douleur est chronique ou persistante, elle devient alors pathologique car elle n'offre plus aucun avantage mais provoque au contraire une extrême souffrance. C'est notamment le cas des douleurs neuropathiques ou inflammatoires qui apparaissent suite à une lésion ou inflammation du système nerveux périphérique ou central. Les traitements disponibles ne sont souvent que partiellement efficaces et peuvent s'accompagner d'effets secondaires importants. Il est donc essentiel de découvrir de nouveaux traitements, et pour ce faire, de disséquer les mécanismes responsables de la genèse d'une douleur chronique.

Parmi les symptômes douloureux, il existe l'allodynie qui correspond à une douleur provoquée par une stimulation normalement non douloureuse qui peut être déclenchée suite à une inflammation.

En temps normal, les informations tactiles et douloureuses n'aboutissent pas au même niveau de la moelle épinière ou du tronc cérébral, les deux modalités sensorielles (tact et douleur) sont donc normalement séparées. En conditions pathologiques, par exemple lors d'une allodynie, l'information tactile devient capable d'activer des neurones nociceptifs, grâce à un circuit qui implique plusieurs cellules. Le tact va alors devenir douleur (allodynie mécanique). Ce processus va provoquer l'activation de plusieurs populations neuronales et implique également une population spécifique de cellules gliales, les astrocytes. Cependant, peu de choses sont connues sur ces cellules et leur implication dans le déclenchement de l'allodynie lors d'une inflammation.

L'objectif sera de déterminer si les astrocytes sont impliqués dans la persistance de l'allodynie induite par une inflammation de la face. Cette inflammation sera provoquée par une injection sous cutanée d'adjuvant complet de Freund (CFA). Nous tenterons ensuite de comprendre les mécanismes cellulaires de leur activation.

Ce projet combinera des études comportementales, électrophysiologiques et immunohistologiques. Il présente donc un intérêt fondamental, et également un intérêt plus appliqué en permettant éventuellement de proposer de nouvelles cibles thérapeutiques visant à diminuer les douleurs pathologiques chez l'homme.

Pour ce projet, nous utiliserons 370 rats sur 3 ans. Pour respecter la règle des 3R, le nombre d'animaux a été réduit au maximum. Ce nombre sera diminué au cours des étapes si les résultats obtenus s'avèrent ne pas être significatifs. De plus, comprendre la physiologie de la douleur nécessite l'utilisation d'animaux pour les études comportementales et pour les études in vitro (électrophysiologie et immunohistologie). Ainsi, aucune méthode alternative actuelle ne permet de remplacer les protocoles nécessaires à la réalisation de ce projet. Enfin, les animaux seront 3 par cage de 800 cm² (enrichissement social) dans l'animalerie thermorégulées (22±1 °C), avec hygrométrie contrôlée et cycle de lumière inversé (lumière de 19h à 7h). L'accès à la nourriture et à l'eau sera ad libitum et un changement de litière sera effectué 2 fois par semaine et la mise en place de points limite.

9717 La maladie de Lyme chez l'homme est provoquée par la bactérie *Borrelia burgdorferi*. Cette bactérie est transmise à l'homme notamment par une piqûre de tique. L'infection peut être traitée par antibiotique si elle est diagnostiquée tôt. Malheureusement, dans la plupart des cas, elle est sous-diagnostiquée ou diagnostiquée trop tard pour que les antibiotiques puissent avoir un effet. Il a été montré que certains patients développent aussi une maladie de Lyme chronique, malgré le traitement antibiotique. Des souris de la souche C3H/He (mais pas les autres souches), infectées

par *Borrelia burgdorferi*, développent systématiquement une arthrite dès une semaine après l'infection, ce qui mime un des symptômes de la maladie de Lyme chronique humaine. Deux semaines après l'infection, une majorité des souris C3H/He développent une arthrite qui est réversible. Ce système expérimental constitue donc un modèle très pertinent pour l'étude de nouveaux traitements contre la maladie de Lyme. Il est particulièrement intéressant dans la perspective de réduire l'utilisation des antibiotiques.

Des expériences *in vitro* ont démontré récemment l'efficacité bactéricide de l'huile essentielle d'origan et de son principal principe actif, le carvacrol, sur plusieurs bactéries dont *Borrelia burgdorferi*. Nous proposons de tester l'efficacité de ces composés *in vivo* sur l'arthrite induite par *Borrelia burgdorferi*. Ces traitements seront administrés dès l'infection, en cherchant à prévenir le développement de l'arthrite. Leur efficacité sera comparée à celle d'un antibiotique actif contre *Borrelia burgdorferi* : la doxycycline.

Par ailleurs, des données non publiées obtenues par un des participants à ce projet, montrent chez les patients souffrant d'une forme chronique de Lyme, une fréquente surexpression d'une molécule appelée IL-1Ra, connue pour ses effets immunosuppresseurs dans d'autres pathologies. Cette molécule surexprimée pourrait être impliquée dans le développement d'une maladie de Lyme chronique en limitant l'action du système immunitaire. Ainsi, nous testerons si des souris C3H/He infectées par *Borrelia burgdorferi* voient leur arthrite réduite par un traitement avec un anticorps dirigé contre cette molécule, signe d'un effet sur le système immunitaire lui permettant de réagir et d'empêcher l'installation de la chronicité de l'infection.

Le nombre de souris proposé pour ce projet, a été calculé de telle manière à ne recourir qu'à un minimum d'animaux pour que les résultats expérimentaux soient significatifs. Le projet prévoit donc le recours à un maximum de 180 souris sur 5 ans. Ces animaux seront hébergés dans un environnement enrichi. Le suivi des animaux sera réalisé tout au long des expériences et évalué grâce à une grille codifiant les signes cliniques de l'arthrite jusqu'à sa réversibilité.

Les résultats obtenus dans cette étude pourraient avoir un intérêt majeur pour le développement de nouveaux traitements alternatifs aux antibiotiques, de la maladie de Lyme chez l'homme.

9718 Le cuivre (Cu) joue un rôle central dans le vieillissement des cerveaux. De plus les plaques d'amyloïde β qui s'accumulent dans le cerveau au cours de la maladie d'Alzheimer sont très riches en Cu. L'homéostasie du Cu est modifiée lors de l'évolution de la maladie. Il a récemment été mis en évidence que les rapports isotopiques naturels du zinc et du fer peuvent être utilisés comme traceurs du comportement des métaux dans l'organisme. En particulier, il a été montré que les différents organes et fluides ont des compositions isotopiques du Zn spécifiques et que le vieillissement du cerveau et la maladie d'Alzheimer affectent le comportement isotopique du Zn. Les changements de rapport isotopiques dans le cerveau sont répercutés et détectables dans le sang.

Le cuivre présente des caractéristiques laissant supposer que la distribution de ces isotopes est plus sensible à des changements de composition des tissus, comme dans le cas de la maladie d'Alzheimer, que le Zinc. Avant de pouvoir utiliser les isotopes du Cu comme outils diagnostiques de maladies, il est nécessaire de conduire une étude systématique du comportement isotopique du Cu dans des organismes sains. En particulier, il est important de tester l'effet du sexe et de l'âge, et du fond génétique sur la composition isotopique du Cu dans différents organes, en particulier le cerveau, le foie, le sang, le rein et les os. Nous allons donc étudier la composition isotopique en Cu de différents organes de souris saines non transgéniques, d'âge, de sexe et de souche variables.

Ce projet est fondé sur la règle des 3R. La répartition des isotopes du cuivre résultant du transport par le sang et de la liaison à différentes molécules dans les organes, cette étude ne peut être réalisée que sur des organismes vivants, et ne peut être remplacée par des expériences *in vitro*. Une étude statistique a été réalisée afin de calculer le nombre d'animal nécessaire pour obtenir des résultats significatifs (10 souris par groupe). De plus, le fond génétique des souris est contrôlé et homogène, ce qui limite la variabilité expérimentale et donc le nombre d'animaux nécessaires. Pour l'ensemble des expériences, nous prévoyons d'utiliser 240 souris, pour une durée de 2 ans. Le projet implique uniquement des prélèvements sanguins tous les trois mois, et un prélèvement sanguin terminal ; tous ces prélèvements sont réalisés sous anesthésie générale. Enfin, le

personnel est très compétent. Les animaux sont maintenus sans isolement, avec enrichissement, et surveillés quotidiennement afin de détecter toute anomalie (prostration, dos rond, piloérection, agressivité) liée au vieillissement ou à l'hébergement. Les animaux présentant l'un de ces signes pendant 3 jours consécutifs ou l'association de 3 de ces critères, ou une perte de poids de plus de 20% en une semaine seront mis à mort afin de limiter toute souffrance animale.

9719 Les rayonnements ionisants (RI) impactent directement la santé des organismes vivants. L'objectif de ce projet est d'évaluer l'effet de faibles doses de RI sur la reproduction d'un animal vertébré, le poisson zèbre. En effet, les RI sont connus pour impacter significativement la reproduction en condition chronique d'exposition, conduisant potentiellement à perturber la structure et le fonctionnement des écosystèmes. Il est donc nécessaire de connaître cet impact pour améliorer l'évaluation du risque écologique. Si un nombre croissant de données montre que les RI affectent les capacités de reproduction (fécondité, succès reproducteur, survie des larves), les mécanismes d'action toxique ne sont pas encore entièrement élucidés. De plus, les données d'effets disponibles sont issues de conditions d'irradiation qui concernent le plus souvent un seul stade de vie, en particulier le stade adulte. Il est donc nécessaire d'acquérir des données sur l'impact des RI sur les capacités de reproduction. Ces études nécessitent l'utilisation d'animaux, afin d'évaluer au mieux l'impact sur la fécondité et la survie des larves. A ce jour, les outils *in vitro* disponibles ne permettent pas une telle évaluation. Le partage des animaux utilisés par ce projet permettra d'enrichir d'autres domaines de recherche menés dans le service. Ils permettront l'étude de la neurotoxicité (cerveau), de l'immunotoxicité (rate), de l'oxydation des protéines (larves) permettant de dresser un bilan des effets de l'irradiation gamma en conditions d'irradiation chronique. Enfin, le nombre d'animaux retenus satisfait les exigences statistiques pour permettre l'obtention de résultats exploitables et publiables. La reproduction est un mécanisme physiologique complexe qui nécessite des conditions d'exposition réduisant au maximum le stress. Le respect du bien-être animal est indispensable au succès de ces expérimentations.

Compte tenu de son mode de reproduction, le poisson zèbre *Danio rerio* fait partie des modèles biologiques d'intérêt majeur pour l'acquisition de données sur cette fonction biologique. En première approche, ce protocole utilisera 200 poissons zèbre adultes pour l'étude de 5 débits de doses en condition chronique d'exposition (+ un contrôle non exposé). De plus, ce projet inclut l'étude des effets transgénérationnels, conduisant au suivi de différents stades de vie (de la descendance issue de parents irradiés jusqu'à l'acquisition de la maturité sexuelle). Un des premiers verrous à lever concerne la survie des larves en conditions d'irradiation. En effet, la métamorphose des larves à 7-8 jpf (jour post fertilisation) nécessite une attention particulière pour assurer l'alimentation des larves. Cette attention n'est pas compatible avec les contraintes de l'installation et du protocole d'irradiation. Par conséquent, le taux de survie des larves ne sera pas optimal conduisant à l'augmentation du nombre de larves suivies.

Cette partie du projet conduira à suivre au maximum 200 *Danio* produits par l'établissement utilisateur. Ainsi, 400 *Danio rerio* adultes au maximum seront utilisés. A cela s'ajoutent 720 larves 10 jpf.

9720 Ce projet a pour but de valider un protocole d'anesthésie adapté à la technique de mesure de la force et de la fatigue musculaire *in situ* chez la souris. Cette technique est nécessaire à la réalisation d'autres projets, évalués par le comité d'Ethique, qui visent à tester de nouveaux candidats médicament chez la souris qui pourraient être utilisés pour soigner ou réduire de façon significative les symptômes de patients souffrants de Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD). Cette maladie est une maladie neuromusculaire caractérisée par une atrophie et une faiblesse musculaire progressives dues à une dégénérescence des muscles squelettiques, lisses et cardiaques. Il existe un modèle de souris mutantes reproduisant cette pathologie qui peut donc être utilisé pour tester de nouveaux traitements. Ainsi le modèle animal ne peut pas être REMPLACÉ dans ce projet.

Le pentobarbital utilisé pour ces techniques n'est plus commercialisé en France. Il s'agit de trouver un anesthésique entraînant une sédation suffisamment profonde sans avoir d'impact sur la contractilité musculaire. Lors d'un précédent projet nous avons testé 3 techniques d'anesthésie pour la mesure de la force musculaire et celle sélectionnée n'avait *in fine* pas permis d'obtenir des

résultats satisfaisants; notamment la diminution de la force musculaire attendue chez les souris mutantes présentant des déficits musculaires importants, qui reproduisent certains éléments de la pathologie humaine (DMD), n'a pas été détectée. 4 autres techniques alternatives seront testées. Une fois l'anesthésique sélectionné, les résultats de mesure de force et de fatigue musculaire obtenus avec celui-ci seront comparés avec ceux obtenus avec la méthode de référence (pentobarbital) sur des souris sauvages ainsi que sur des souris mutantes (présentant un déficit musculaire) afin de s'assurer de la répétabilité des résultats.

REDUCTION : nous estimons le nombre de souris nécessaire à 62 souris "sauvages" adultes et 30 souris mutantes. La DMD affectant les garçons, nous utiliserons des souris mâles. Le nombre de souris pourra être diminué au cas où un des premiers anesthésiques testés donnera satisfaction. Cependant il serait intéressant de tester les 4 techniques sélectionnées afin d'avoir des techniques de substitution en cas de changement de législation sur les anesthésiques. Etant donné que nous avons déjà des données de mesure de force musculaire sur souris sauvages et mutantes avec anesthésie au pentobarbital, les données obtenues avec le nouvel anesthésique sélectionné pourront être comparées à ces dernières, sans nécessité de réutiliser des animaux.

RAFFINEMENT : L'anesthésique utilisé couramment pour ce protocole, le pentobarbital, n'est plus produit en France et la technique à l'isoflurane que nous avons sélectionnée n'est pas satisfaisante. Nous allons donc être amenés à tester 4 autres protocoles d'anesthésie afin de le remplacer. Pour cela nous prévoyons dans un premier temps de tester chacun des 4 anesthésiques sur 4 souris sauvages afin de sélectionner l'anesthésique qui apporte la meilleure sédation dans les conditions opératoires fixées par les deux protocoles. L'anesthésique choisi sera ensuite testé sur 10 souris sauvages et 10 souris mutantes pour chacun des protocoles (mesure de force musculaire et mesure de fatigue musculaire) afin de s'assurer que les mesures sont comparables avec celles obtenues sans anesthésie au Pentobarbital.

9721 Les cancers font partie des maladies les plus complexes à traiter. Parmi les différents types de cancer, ceux dits solides comme les cancers pancréatiques et pulmonaires sont très agressifs, ils répondent peu aux traitements actuels et de nombreuses rechutes sont observées. Il est donc nécessaire aujourd'hui de tester de nouvelles thérapies anti-tumorales dans des systèmes *in vivo*, qui contrairement au système *in vitro*, reflètent de façon plus précise les réponses attendues chez les malades.

En plus d'être peu efficaces, les thérapies standards contre les cancers solides sont également très toxiques car elles tuent toutes les cellules de l'organisme et pas uniquement les cellules tumorales. Basé sur une des propriétés de notre système immunitaire qui est de reconnaître et de tuer spécifiquement les cellules tumorales grâce à des cellules spécialisées appelées lymphocytes (ou cellules) T, notre projet a pour objectif d'étudier l'efficacité d'une nouvelle thérapie anti-tumorale basée sur des cellules T nommées CAR T (pour Chimeric Antigen Receptor T cells) qui ont été modifiées génétiquement pour être spécifiques de la tumeur et qui sont donc extrêmement efficaces.

Des résultats cliniques probants ont été obtenus avec cette thérapie dans le traitement des lymphomes, mais malheureusement, à ce jour, les tumeurs solides répondent peu à ce traitement. Notre projet permettra de comprendre pourquoi ces cellules ne fonctionnent pas sur les tumeurs solides et de proposer des stratégies pour les rendre plus efficaces. Seule l'expérimentation animale mimant fidèlement le microenvironnement tumoral nous permettra de répondre à cette question.

Notre schéma expérimental consistera dans un premier temps à faire pousser des tumeurs humaines de type hématologique ou solide dans des souris immunodéficientes via 2 procédures différentes, en inoculant des cellules tumorales par voie sous-cutanée ou intra-pancréatique. Après la croissance des tumeurs, les souris seront soit euthanasiées de façon à récupérer les tumeurs et à pouvoir tester l'efficacité des CAR T *ex vivo* grâce à des techniques d'imagerie, soit maintenues en vie de façon à être traitées avec les mêmes cellules. Ces expériences permettront à la fois d'expliquer le mécanisme d'action des CAR T, de comparer ces résultats à ceux obtenus *in vitro* au préalable mais également de tester directement leur efficacité à traiter des souris porteuses de ces tumeurs. Cette étude nécessitera un total de 600 souris pour une période totale de 5 ans.

Pour respecter le principe des 3R, nous veillerons à ce que toutes les expériences qui pourront être réalisées in vitro le soient et que le nombre de souris utilisées soit réduit au minimum. Pour éviter toute souffrance, les procédures d'injection de cellules tumorales en sous-cutané ou de cellules CAR T en intraveineuse se feront après administration d'une crème anesthésiante. Les injections en intra-pancréatique nécessitent une prise en charge de la douleur plus importante et se feront sous anesthésie générale et avec administration préalable d'analgésique. De plus, afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligées aux souris, elles feront l'objet d'une surveillance journalière avec ré administration d'analgésique en cas de besoin. Enfin, si les points-limites préalablement établis sont atteints, l'animal sera euthanasié de façon anticipée de façon à éviter toute souffrance.

A terme, les résultats obtenus grâce à cette étude, permettront de comprendre plus précisément le mode d'action des cellules CAR T et de les proposer comme des traitements anti-tumoraux efficaces aux patients atteints de tumeurs solides, de type pancréatiques et pulmonaires.

9722 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. 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 plasmacytoides (pDCs) sont des cellules de l'immunité innée qui ont un rôle clé pour contrer les infections. En effet, elles détectent les composants viraux et, en réponse, sécrètent des molécules antivirales, telles que l'interféron.

Notre projet vise à déterminer le rôle des pDCs au cours de l'infection par 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 la mise à mort 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). Les animaux infectés resteront donc en observation pour une surveillance des symptômes cliniques de l'infection.

9723

Le mélanome cutané est une tumeur agressive dérivée des mélanocytes. Alors que le mélanome précoce peut être traité par la chirurgie, il n'existait jusqu'à récemment aucun traitement satisfaisant pour les mélanomes avancés. Les progrès spectaculaires de l'immunothérapie ouvrent des perspectives particulièrement intéressantes, au-delà même du mélanome. Toutefois, les études cliniques montrent que tous les patients ne répondent pas de la même façon. Une autre piste possible a consisté à développer des traitements ciblant une voie de signalisation dont l'activation constitutive est fréquente dans le mélanome et associée à deux types de mutations présentes dans 50% et 15% des cas. Des inhibiteurs de la mutation majoritaire tels que le Zelboraf et le Talinfar approuvés par la FDA en 2011 et 2013 respectivement ont montré des résultats spectaculaires chez des patients atteints de mélanome métastatique. Bien qu'actuellement prescrits en clinique, leur utilisation pose plusieurs problèmes dont le principal est l'émergence quasi systématique de mécanismes de résistance. De plus, ces inhibiteurs spécifiques ne peuvent être utilisés chez les patients non porteurs de la mutation, laissant la moitié des patients sans thérapie ciblée disponible. Ces mutations sont des événements précoces de la progression tumorale apparaissant dès le stade bénin (nævus). Elles sont mutuellement exclusives suggérant que chacune est suffisante pour déréguler la voie de signalisation. Toutefois, les spécificités des différents types de mélanome en fonction de la nature de la mutation ont non seulement des conséquences en matière de traitement ciblé potentiel, mais mettent également en évidence la complexité de cette voie in vivo et le besoin de développer des modèles précliniques.

Des modèles murins des deux formes de mutations ont été développés par la communauté scientifique. Ces animaux qui développent un mélanome cutané sont des modèles particulièrement adaptés à nos études comparées aux systèmes in vitro car ils récapitulent la séquence d'événements de la mélanomagenèse observée chez l'homme depuis la formation de nevi au développement de métastases dans certains cas.

Dans ce contexte, nous cherchons à comprendre le rôle respectif des effecteurs directs de la mutation minoritaire dans les différentes étapes de la progression tumorale, des études in vitro préliminaires ayant indiqué des contributions différentielles sur cultures de mélanome humain. Ce projet repose sur l'utilisation de lignées de souris transgéniques ou déficientes pour les gènes d'intérêt. Ces modèles nous permettent d'étudier in vivo leur rôle non seulement dans le développement normal du lignage mélanocytaire mais également dans la formation des mélanomes.

Nous développons également un projet qui repose sur l'observation in vitro et sur prélèvements de patients que certaines résistances aux traitements ciblés peuvent être liées à une activation du complexe d'initiation de la traduction, impliqué dans l'oncogenèse et/ou la progression tumorale de certains cancers. Des souris double knockout constitutifs pour le régulateur négatif de l'initiation de la traduction sont croisées avec les deux modèles de mélanome. Ces animaux constituent des modèles précliniques pour la caractérisation des mécanismes de résistance et le développement de tests thérapeutiques de molécules bloquant ces phénomènes de résistance.

L'ensemble de ce projet d'une durée de 5 ans requiert un nombre total d'animaux estimé à 2606. Il comprend la génération de 6 modèles différents de souris au génotype complexe comprenant jusqu'à 6 loci modifiés. Le phénotype et le développement de tumeurs seront analysés. 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. Dans le cadre des procédures, tous les soins pré- et post-opératoires seront réalisés pour garantir le meilleur confort à l'animal. Des xénogreffes sous-cutanées ou sous-

scapulaires permettront le maintien et l'amplification des tumeurs primaires de façon à diminuer le nombre d'animaux nécessaires à la génération des modèles. Les stratégies d'accouplement ont été optimisées afin de réduire le nombre d'animaux.

La réalisation de ce projet de recherche pourrait permettre d'identifier de nouveaux acteurs clés de la carcinogenèse du mélanome et de proposer de nouvelles approches thérapeutiques ciblées ce qui nécessite une bonne compréhension des mécanismes moléculaires liés au développement de la pathologie.

9724 Les infections fongiques invasives sont une cause majeure de morbidité et de mortalité, avec plus de 800 000 décès par an dans le monde. Les espèces *Candida albicans* et *Candida glabrata* sont les pathogènes les plus souvent incriminés dans les infections fongiques à levures. Actuellement, seules quatre classes de médicaments sont disponibles pour traiter ces infections. Ces médicaments agissent en ciblant la paroi et la membrane fongiques, ou en inhibant la synthèse des acides nucléiques. Le nombre limité de traitements antifongiques, le coût élevé et la toxicité des médicaments disponibles, l'augmentation des souches résistantes et l'augmentation du nombre de patients à traiter rendent indispensables (i) le développement de nouveaux agents thérapeutiques et (ii) l'amélioration de l'efficacité et de la tolérance des médicaments existants.

Ce projet consiste à étudier l'efficacité d'une nouvelle formulation adaptée aux molécules antifongiques basée sur l'utilisation de nanoparticules lipidiques qui englobent les antifongiques afin d'augmenter l'affinité des molécules pour les cellules fongiques (et ainsi de diminuer la toxicité pour les cellules humaines) et d'augmenter leur diffusion tissulaire (et ainsi d'augmenter leur efficacité). Des études réalisées *in vitro* avec sur *C. albicans* et le posaconazole (famille des azolés) dans des fungidots montrent une augmentation d'efficacité antifongique en comparant au posaconazole seul. A ce stade, des expérimentations animales sont indispensables afin de confirmer la pertinence thérapeutique de cette nouvelle formulation. Les modèles cellulaires ne permettent pas d'analyser la réponse immunitaire associée à une infection. Le recours à des animaux vivants (modèle murin) est indispensable pour évaluer l'efficacité réelle des traitements.

Les animaux étudiés seront des rongeurs nés en captivité et provenant d'élevages reconnus et autorisés. Le nombre d'animaux nécessaire a été évalué à 96 grâce aux expériences décrites dans la littérature et a été réduit au maximum tout garantissant la significativité des résultats. Les animaux seront hébergés dans une structure adaptée, surveillés durant toute l'expérience afin de détecter tout signe d'inconfort. Des critères d'arrêt de l'expérience sont définis précisément et permettent d'éviter toute souffrance. Les protocoles d'anesthésie sont clairement établis

9725 Les cancers colorectaux et mammaires métastatiques sont encore aujourd'hui de mauvais pronostic, avec un taux de survie très faible à 5 ans. Même si la chimiothérapie traditionnelle peut contrôler ces cancers et prolonger l'espérance de vie, ils posent toujours des problèmes de par leur forte toxicité et leur manque de spécificité, limitant fortement les doses acceptables par le patient. En outre, des sous-populations cellulaires, connues sous le nom de cellules souches cancéreuses (CSCs), sont hautement résistantes à ces thérapies conventionnelles. Ces CSCs sont d'autre part vraisemblablement responsable des processus de dissémination, de récurrence des cancers, notamment de par leurs caractéristiques communes avec des cellules souches normales telles que l'auto-renouvellement, la pluripotence, la dormance et la résistance aux médicaments.

De ce fait, nous avons émis l'hypothèse que ces problèmes susmentionnés pourraient être résolus par la nanomédecine, qui est considérée comme l'une des options les plus prometteuses contre le cancer à ce jour. Les nanoparticules ont le potentiel d'améliorer la biodisponibilité des médicaments hydrophobes, pour délivrer des agents anticancéreux sur le site ciblé avec moins de toxicité et pour soutenir la libération du médicament.

Étant intéressé par la plasticité cellulaire, nous avons créé des populations colorectales et mammaires de cellules enrichies en CSCs par modification du milieu cellulaire nutritif. Nous souhaitons utiliser ces outils cellulaires pour analyser *in vivo* chez la souris (NMRI-nude) l'efficacité d'agents anticancéreux (libres et encapsulées) en association avec de molécules comme la salinomycine ou le RU486, ciblant de façon plus spécifique les CSCs. En conformité avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement, le nombre total d'animaux inclus dans

ce projet (n=704) a été réduit au minimum nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement interprétables et reproductibles. Une définition précise des points limites et une surveillance adaptée des animaux par du personnel compétent permettra de limiter au maximum toute souffrance animale.

9726 Chez l'homme, des mutations du transporteur de l'hormone thyroïdienne MCT8 sont associées au syndrome d'Allan-Herndon-Dudley (AHDS). Les patients atteints de cette maladie présentent une forme sévère de retard psychomoteur, avec des concentrations d'hormone thyroïdienne anormales. La mutation du transporteur MCT8 empêche l'hormone thyroïdienne d'atteindre le cerveau. Les symptômes sont en accord avec le rôle critique joué par cette hormone durant le développement et la maturation du cerveau. Aucun traitement pour cette maladie n'est disponible.

Afin de modéliser cette maladie, une lignée de souris a été créée (MCT8KI). Ces souris portent la mutation humaine AHDS qui entraîne le syndrome le plus sévère, mais elles ne présentent pas de phénotype dommageable. Nous utiliserons ce modèle pour tester une nouvelle molécule synthétisée pour essayer de rétablir des concentrations normales d'hormone thyroïdienne dans le cerveau. Le composé à tester sera administré quotidiennement par injection sous-cutanée, pendant 14 jours.

Un tel essai ne peut être réalisé qu'in vivo, en raison de la complexité des mécanismes qui contrôlent l'entrée de produits dans le cerveau. Ces mécanismes ne peuvent actuellement pas être modélisés in vitro.

Cet essai nécessitera l'utilisation de 72 souris au maximum. Ce nombre a été réduit au minimum nécessaire pour pouvoir interpréter statistiquement les résultats obtenus. Les souris seront surveillées tout au long de l'expérience pour détecter d'éventuels effets indésirables du traitement. Des points limites ont été définis de façon à éviter toute souffrance inutile des animaux.

9727 La stéatose hépatique d'origine non alcoolique (NAFLD en anglais) est une maladie du foie très répandue associée à l'obésité. Elle est évolutive et peut, à terme, se transformer en fibrose ou même en cirrhose. Aucun traitement n'existe pour ces stades avancés. Déterminer les voies qui contrôlent ces transformations peut permettre d'identifier des cibles pharmacologiques potentielles pour lutter contre ces maladies. ERR α (Estrogen Related Receptor alpha) est une protéine impliquée dans la biogénèse et le métabolisme des lipides, ce qui en fait un bon candidat pour prévenir la stéatose hépatique. Une baisse des concentrations hépatiques d'ERR α est observée au cours de l'évolution de la maladie. D'autre part l'expression d'ERR α dans le foie diminue dans plusieurs modèles murins où la NAFLD a été déclenchée par divers protocoles. Nous utiliserons des souris qui n'expriment plus ERR α spécifiquement dans le foie, afin de déterminer si ces souris sont plus sensibles à la NAFLD associée à l'obésité ou si les baisses d'ERR α dans le foie associé à la NAFLD ne sont qu'un marqueur de l'avancée de la maladie.

Seule une étude in vivo peut permettre d'évaluer le rôle d'ERR α dans le développement de la NAFLD, car cette maladie métabolique du foie ne peut être modélisée in vitro à l'heure actuelle.

Le nombre maximum de souris prévu pour cette étude est de 64. Ce nombre a été déterminé de façon à pouvoir interpréter statistiquement les résultats obtenus, en tenant compte de la variabilité interindividuelle attendue dans ce genre d'étude.

Les souris seront pesées trois fois par semaine et des points limites adaptés au régime obésogène ont été fixés de façon à éviter toute souffrance inutile des animaux.

9728 En France, le cancer colorectal se situe au troisième rang des cancers les plus fréquents : le deuxième chez les femmes et le troisième chez les hommes. Il survient en grande majorité chez les personnes âgées de 50 ans et plus. Selon les estimations, le nombre de cancers colorectaux devrait augmenter dans les prochaines années pour atteindre 45 000 nouveaux cas annuels en 2020. Malgré le nombre croissant de molécules thérapeutiques, les progrès thérapeutiques restent modestes. L'un des principaux obstacles est inhérent à l'absence d'une délivrance spécifique des médicaments dans le tissu tumoral. En outre, la majorité des substances thérapeutiques engendrent des effets secondaires liés à des effets toxiques au niveau des tissus sains. Une autre limitation

importante est la présence de barrières biologiques (par exemple, la barrière endothéliale) qui limitent l'extravasation de molécules thérapeutiques en doses suffisantes vers le tissu cible.

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

Objectif 1 : d'un protocole de chimiothérapie, le Folfox

Objectif 2 : d'un protocole de chimiothérapie, le Folfox combiné avec l'irinotécan.

Les effets thérapeutiques de ces thérapies sur la croissance et la perfusion tumorale seront évalués sur un modèle murin de cancer colorectal sous-cutané et métastatique dans le foie par imagerie ultrasonore.

La prise en compte de la règle des 3R se décline par :

Remplacement : Dans une première approche expérimentale, nous avons réalisé des expériences in-vitro dont les résultats sont particulièrement encourageants et nécessitent d'être validés avec un modèle préclinique. Par conséquent, à cette étape du projet, le modèle animal ne peut être substitué par un autre modèle d'étude in-vitro ou in-silico.

Réduction : Sur la base de nos études antérieures, notre étude nécessite 290 souris. Les groupes contrôles et expérimentaux seront constitués de 10 souris. Nous réaliserons une étude statistique pour déterminer si ces différentes thérapies permettent une diminution significative de la croissance tumorale (voire une éradication de la tumeur) et une augmentation de la survie des animaux.

Raffinement : Les souris seront hébergées par groupe de 10 en présence d'un objet d'enrichissement (morceaux de carton). Les animaux seront observés une fois par jour afin d'évaluer leur stress/leur douleur après les différentes procédures réalisées sous anesthésie. La douleur sera prise en charge par une analgésie adaptée.

9729 Ce projet s'inscrit dans l'étude des changements métaboliques qui sont observés chez des sujets obèses ou diabétiques qui subissent une chirurgie de l'intestin. La chirurgie bariatrique est l'une des approches les plus utilisées pour lutter contre les formes sévères d'obésité chez l'homme. Il a été observé chez ces patients, une amélioration rapide et significative des paramètres métaboliques comme une amélioration de la glycémie (lorsqu'ils sont diabétiques) avant toute perte de poids. Il existe sûrement des signaux (nerveux ou hormonaux) qui sont modifiés de façon précoce lors de cette chirurgie. Le modèle utilisé sera 260 rats de souche WISTAR chez lequel la chirurgie bariatrique sera effectuée afin d'identifier ces mécanismes. La technique chirurgicale effectuée dans cette étude sera la SADI-S (single anastomosis duodeno-ileal bypass with sleeve gastrectomy). La SADI-S est une intervention associant gastroplastie longitudinale à une dérivation intestinale pratiquée chez les patients obèses (avec ou sans diabète). Il s'agit d'une technique récente amenée à se développer et à s'intégrer dans l'arsenal des interventions de chirurgie de l'obésité. Il s'agit donc, dans notre étude, d'identifier les mécanismes concourant à la perte de poids et à l'amélioration de la glycémie suite à une SADI-S. Parmi les mécanismes envisagés, nous pensons que des changements de sécrétions hormonales gastro-intestinales peuvent se produire (comme la ghréline ou le GLP-1) ainsi que d'autres hormones pancréatiques (insuline, glucagon) ou du tissu adipeux (leptine, adiponectine, résistine). La chirurgie bariatrique peut également avoir un impact sur le comportement alimentaire. Celle-ci sera suivie d'une parasymphectomie ou d'une sympsectomie. En effet, le nerf vague (Nerf X, pneumogastrique) est la voie majeure de communication bidirectionnelle entre le système nerveux central et les organes périphériques, le tractus gastro-intestinal, la digestion et l'absorption des nutriments, joue un rôle critique dans la régulation de l'homéostasie énergétique. Les signaux qui proviennent du tractus gastro-intestinal sont nécessaires au contrôle de la fonction intestinale et de la régulation de la prise alimentaire. Nous émettons l'hypothèse que certains effets de la chirurgie pourraient impliquer le nerf vague.

Pour ce projet, l'approche chirurgicale ne peut - être substituée par autre méthode ou technique, dans un souci de raffinement nous veillerons en continu 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, en adéquation avec la règle des 3R : Réduire pour diminuer le nombre d'animaux utilisés, Remplacer quand il est possible de travailler sur des cellules ou des tissus, Raffiner pour réduire; supprimer ou soulager la douleur ou la détresse des animaux.

9730 La consommation de tabac est la première cause de mort évitable dans les pays développés. La nicotine est la principale substance active responsable de l'addiction au tabac. Elle agit dans le cerveau via les récepteurs à la nicotine, qui sont aussi les récepteurs de l'acétylcholine (nAChRs), un neurotransmetteur excitateur du cerveau. De récentes études génétiques chez l'homme ont révélé que des mutations de ces récepteurs sont corrélées à la dépendance à la nicotine, mais aussi à l'alcoolisme. Mais ces études ne permettent pas de préciser la nature causale de cette association. Des analyses *in vitro* suggèrent que ces mutations diminuent l'effet de la nicotine sur ces récepteurs, mais pour comprendre l'impact d'un gène (CHRNA3/A5/B4) sur la dépendance au tabac ou à l'alcool, il est essentiel d'avoir recours à des analyses *in vivo* permettant de déterminer les effets de la manipulation de l'expression de ces gènes sur les comportements d'intérêt (addictions). La souris est une espèce de référence pour l'étude du système nerveux central chez les vertébrés supérieurs, et permet offre un excellent compromis entre une organisation du système nerveux permettant une extrapolation raisonnable à l'espèce humaine, l'évaluation du comportement, la connaissance avancée de sa génétique et la maîtrise de facteurs environnementaux. Il est ainsi possible de relier les données de la génétique à l'altération de molécules/récepteurs spécifiques dont le rôle peut être analysé. Dans notre cas, le rôle de mutations des nAChRs dans les addictions peut être étudié à l'aide de souris dépourvues de ces récepteurs (knockout), ainsi que de souris exprimant une mutation des nAChRs que l'on retrouve chez l'homme (knockin). Le comportement de prise de nicotine/alcool (auto-administration) est évalué grâce à un test basé sur un choix effectué dans un labyrinthe en Y, permettant à l'animal d'exprimer une préférence (ou un évitement) pour le bras du labyrinthe associé à des injections de nicotine ou d'alcool. Parallèlement, on mesure aussi l'état anxieux chez les mêmes animaux. A la fin des derniers tests d'auto-administration de drogues, le cerveau des animaux sera prélevé pour des analyses *in vitro* permettant de déterminer les effets de la mutation sur l'activité des neurones dopaminergiques en réponse à la nicotine et à l'alcool, et de confirmer leur identification. Des animaux différents recevront préalablement de la nicotine pendant 30 jours (pompes osmotiques), de façon à déterminer si cette préexposition ne pourrait pas faciliter de façon retardée la prise ultérieure d'alcool. Tout au long des expériences, la règle des 3R sera mise en application à l'aide de différentes modalités. Les expériences sont conçues en amont de façon à optimiser le recueil des données pour chaque animal grâce à l'application de différents tests de façon longitudinale qui permet de beaucoup réduire le nombre d'animaux utilisés. L'utilisation de pompes osmotiques sous-cutanées pour les traitements chroniques (nicotine) est aussi conforme à cette règle : elle permet l'administration continue de substances en garantissant des taux plasmatiques constants, moins d'effets indésirables, pas de branchements externes ni intervention humaine et l'élimination des programmes d'injections répétées. Concernant les conditions de vie, les animaux sont hébergés par groupe de 4-5 avec à disposition des tunnels de jeu et différents matériaux de construction du nid. Enfin, concernant la seule procédure à niveau de douleur modérée de ce projet : la chirurgie stéréotaxique, elle associe l'anesthésie générale pour l'opération à un traitement post-opératoire anti-inflammatoire. La convalescence dure 7 jours, au cours desquels l'état général des animaux est évalué quotidiennement. Dans les rares cas (1 à 2% des animaux) où la récupération n'est pas rapide et totale, des points limites spécifiques (voir procédures) entraîne l'application de traitements antalgiques, puis d'euthanasie en l'absence d'amélioration sous 2-3 jours. Les résultats significatifs obtenus au cours de ce projet pourraient contribuer au développement de nouvelles stratégies pharmaceutiques permettant de faciliter l'arrêt de la consommation excessive de nicotine et /ou d'alcool en ciblant les nAChRs. L'effectif total d'animaux nécessaires à la réalisation du projet est estimé à 390.

9731 Le cancer du pancréas est parmi les 5 causes les plus importantes de mortalité par cancer et c'est également le seul cancer dont la mortalité est en augmentation actuellement, pouvant devenir à l'horizon 2020 la seconde cause de mortalité par cancer. Il y a donc une absolue nécessité à améliorer les différents traitements qui ciblent ce cancer. La chimiothérapie est l'un des traitements couramment utilisés dans ce type de cancer. Toutefois, malgré des effets secondaires importants, ce traitement va très souvent être inefficace avec une adaptation des cellules cancéreuses au traitement et donc une chimiorésistance importante. Le but de notre projet est double. Tout d'abord valider les observations réalisées *in vitro* qui permettent d'expliquer la résistance des cellules cancéreuses à la chimiothérapie dans un modèle *in vivo*. Puis dans un second temps proposer une molécule, dont les effets ont été observés *in vitro*, qui va permettre d'induire la mort des cellules cancéreuses résistantes à la chimiothérapie.

Les retombées dans le domaine de la cancérologie sont importantes. Tout d'abord en mettant en évidence *in vivo* un mécanisme responsable de la chimiorésistance, qui pourra ensuite être extrapolé à d'autres types de cancer. Ensuite en proposant une nouvelle molécule thérapeutique on souhaite augmenter l'efficacité des traitements et potentiellement, en réduisant la dose de chimiothérapie, diminuer les effets secondaires dus au traitement. Pour cela nous devons donc réaliser des expériences *in vivo* sur des animaux vivants, avant d'envisager une application clinique des agents pharmacologiques.

Ce protocole induira l'utilisation au maximum de 688 animaux.

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

Réduire : le nombre d'animaux par groupe a été réduit au maximum sans toutefois compromettre l'analyse statistique des résultats. Seule la molécule la plus efficace *in vitro* sera testée *in vivo* chez l'animal.

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

9732 La transplantation d'organe représente le meilleur traitement des insuffisances d'organes terminales. Après transplantation, des phénomènes de rejet mettent en péril la fonction des greffons.

Au cours du rejet, les lymphocytes du receveur envahissent et détruisent le greffon. De façon intéressante, les vaisseaux du greffon par lesquels les lymphocytes du receveur circulent restent relativement indemnes de tout dégât, par rapport au tissu interstitiel du greffon. Il semble donc exister un élément protecteur des structures vasculaires contre l'action des lymphocytes du receveur.

Or, les vaisseaux expriment de façon importante la protéine CD31, par rapport aux cellules interstitielles du greffon. On sait que le CD31 est capable d'inhiber certaines cellules immunitaires. Il est possible que le CD31 soit à l'origine de la protection des vaisseaux observée au cours des rejets de greffe.

Pour tester cette hypothèse, nous mettrons au point et utiliserons un modèle murin de GVH (Graft-versus-Host disease), correspondant à une sorte de "rejet cellulaire inversé", où on injecte des lymphocytes par voie intraveineuse à des souris dépourvues de lymphocytes (souris RAG2KO). Dans ce modèle, les lymphocytes injectés vont reconnaître la souris receveuse comme étrangère et induire des dommages tissulaires.

En utilisant comme receveuses des souris déficientes pour le gène du CD31 (CD31 KO et CD31^{del13-14}), il sera possible de savoir si cette protéine est à l'origine d'une protection des structures vasculaires.

Par ailleurs, nous comptons également utiliser un modèle de greffe d'ilots pancréatiques dans lesquels le gène CD31 aura été surexprimé, pour voir si cela confère aux ilots une résistance contre les phénomènes de rejets cellulaires.

Ce projet concerne un total de 98 animaux.

Il répond aux exigences de Réduction du nombre d'animaux (nombre minimal de 3 animaux par groupe pour la procédure 1, et 5 animaux par groupe pour les procédures 2 et 3 ; la procédure 2 ne sera réalisée qu'en cas de succès de la procédure 1) et de Raffinement (anesthésie générale à l'isoflurane avant injections intraveineuses, anesthésie générale par injection de Kétamine/Xylazine avant chirurgie ; les souris utilisées dans les modèles de GVHd se verront administrer des traitements antalgiques à base de Doliprane et de Metacam). Nombre d'expériences de cytotoxicité seront réalisées in vitro en parallèle des procédures 1 et 2, ce qui répond aux exigences de Remplacement.

9733 Notre laboratoire met à profit ses plateformes brevetées pour offrir un large panel de services de production d'anticorps chimériques humains, adressé aux laboratoires académiques de recherche comme aux industriels du Diagnostic et l'industrie de la Pharmaceutique. Les kits de diagnostic immunologique clinique consistent en la recherche d'un anticorps d'isotype donné, IgG, IgA, IgM et IgE, spécifique d'une cible donnée (bactérie, virus, moisissure, allergène alimentaire, marqueur métabolique, marqueur tumoral, marqueur d'auto-immunité...). Ces kits nécessitent la présence d'un contrôle positif représenté actuellement par un sérum humain et l'existence d'anticorps de référence pour le contrôle de qualité des kits en phase de production ou la calibration des kits (manuels ou automates) pour l'utilisateur final (laboratoires d'analyse médical ou laboratoires des centres hospitaliers ou centres de référence).

Pour les pathologies à faible prévalence, il est parfois difficile d'obtenir, de façon récurrente, ou à un coût raisonnable ou prévisible, un sérum humain ayant la spécificité souhaitée et ces problèmes de reproductibilité voire d'approvisionnement constituent souvent un frein à la commercialisation.

Cette production permettrait :

- une garantie d'innocuité (absence de contamination d'agents pathogènes),
- une production robuste industrielle, respectueuse des contraintes réglementaires, s'appuyant sur des procédés de bioproduction in vitro,
- une évolution dans la production d'anticorps car la législation va dans le sens de la suppression progressive de ces produits d'origine humaine,
- une standardisation des contrôles positifs proposés (réactivité, concentration...). Ceci est une garantie de reproductibilité des tests dans un souci de participer à l'amélioration du diagnostic médical,
- l'offre du développement « sur mesure » de l'anticorps, d'optimisation et de validation de procédés transférables de production très précocement dans le procédé limitant au maximum le nombre d'animaux nécessaires pour chaque développement est pour le client une garantie de développer l'outil parfaitement adapté à sa problématique et donc à celle de son client final (l'utilisateur final du kit de diagnostic) selon les attentes du cahier des charges d'un dispositif médical.

Une réponse immunitaire de qualité et in-vivo est nécessaire afin d'obtenir des anticorps ayant la plus forte affinité pour la cible, l'antigène donné. C'est pourquoi l'utilisation de la souris est nécessaire. En effet, afin de produire des anticorps humanisés, ces souris génétiquement modifiées permettent de reproduire une réaction immunitaire équivalente et donc d'avoir des anticorps très proches de ceux retrouvés chez des malades. L'immunisation se fait par injection péritonéale de l'antigène.

La technique de production du laboratoire permet de minimiser le nombre d'animaux utilisés. En effet, dès les premiers stades d'expérimentation, les plasmas des animaux sont testés afin d'évaluer la présence des anticorps d'intérêt et leur affinité.

Tous les prélèvements sanguins sont effectués sous anesthésie gazeuse afin de réduire la douleur et le stress de l'animal. Les animaux sont ensuite surveillés tous les jours par les utilisateurs et les zootechniciens de l'animalerie afin de vérifier qu'il n'y a pas de souffrance liée à l'immunisation.

A partir de là, les souris présentant des anticorps spécifiques seront euthanasiées afin de prélever les cellules péritonéales, de la rate, des ganglions ou de la moelle osseuse et de les fusionner avec des cellules issues de myélomes afin d'obtenir des cellules immortalisées appelées hybridomes.

Sur les 5 ans à venir, nous souhaitons tester environ 200 antigènes différents, ce qui nous conduit à inclure 2000 souris dans nos protocoles d'expérimentation. Ces animaux subiront des procédures

expérimentales légères qui sont des prélèvements sanguins ainsi que des injections intrapéritonéales.

9734 La radiothérapie-chimiothérapie concomitante est un des traitements de référence des cancers ORL localement avancés. L'adjonction de chimiothérapie ou de thérapies ciblées (anticorps anti-EGFR, cetuximab) à la radiothérapie a permis d'accroître son efficacité. Cependant, le taux de récurrence locale après traitement demeure élevé (environ 50 %). Une sous-population de cellules, les cellules souches cancéreuses (CSCs), semblerait être impliquée dans les résistances au traitement. En effet, elles présentent une résistance à la mort cellulaire par apoptose, du fait d'une surexpression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2. Le ciblage des CSCs, à travers celui de la protéine Bcl-2, semble donc prometteur.

L'ABT-199 est une thérapie ciblant spécifiquement la protéine Bcl-2. Elle est utilisée en oncologie, dans le traitement des rechutes de leucémie lymphoïde chronique, mais n'a pas fait l'objet d'évaluation dans le traitement des tumeurs solides.

Il a été montré, *in vitro*, que l'association de l'ABT-199 au cetuximab et à l'irradiation photonique semblait inhiber de façon synergique la prolifération, l'invasion, la migration et la croissance tumorale en 3D de lignées radiorésistantes issues de cancers ORL, et de leur sous-population de CSCs.

L'objectif de ce travail est de confirmer, sur un modèle murin, l'efficacité de l'association de l'ABT-199 au cetuximab et à la radiothérapie, ainsi que les toxicités potentielles de cette association. Ce travail constitue un prérequis incontournable à une étude clinique de phase 1 chez l'homme. De ce fait, l'utilisation d'un modèle *in vivo* est indispensable pour se rapprocher au plus près de la pathologie humaine. Le modèle murin nous permettra notamment d'apprécier de façon précise la toxicité et de tolérance du traitement. Il n'existe pas à l'heure actuelle de modèle informatique ou autre pouvant remplacer ce modèle animal.

Compte-tenu des objectifs, un modèle de souris immunodéprimées et xénotransplantées sur la patte arrière apparaît comme étant pertinent. Le nombre d'animaux a été calculé à minima par rapport à l'effectif nécessaire pour une exploitation statistique des résultats et a été fixé à 48 souris. Celles-ci ont été randomisées en 4 groupes de 12 souris : un premier groupe de souris contrôle, un groupe de souris recevant une irradiation à la dose de 2 Gy, un groupe de souris recevant les deux traitements ABT-199 et Cetuximab associés ainsi qu'un groupe de souris qui bénéficiera d'une irradiation de 2 Gy combinée à l'association de l'ABT-199 et du Cetuximab. Des mesures de raffinement ont également été prévues. Les points limites de l'expérimentation, prédictifs d'une souffrance potentielle des animaux, ont été fixés à une valeur de 10% de perte de poids corporel, une altération de l'état général, un volume tumoral supérieur à 1200 mm³, une ulcération tumorale ou une atteinte de la motricité de l'animal. La dose d'ABT-199 et de Cetuximab sera précisément calculée avant chaque administration en fonction du poids de l'animal. Les animaux bénéficieront d'une surveillance quotidienne afin de détecter tous comportements anormaux, douleur ou souffrance. La présence de signes de souffrance conduirait à l'administration d'antalgiques voir à l'arrêt de l'expérimentation si ces signaux persistent. Les conditions d'hébergement dans des cages ventilées et le nombre d'animaux par cage ont été prévus selon la réglementation en vigueur. En plus des expérimentateurs, du personnel habilité effectuera la surveillance quotidienne des souris en veillant au change régulier de leurs litières ainsi que le suivi de la consommation d'eau et de nourriture.

9735 Notre projet s'inscrit dans une thématique de recherche fondamentale qui vise à comprendre l'évolution génomique qui sous-tend l'évolution des espèces.

L'un des projets de notre équipe s'intéresse aux bases génomiques de la convergence phénotypique. Le but est de déterminer si lorsque des espèces indépendantes convergent au cours de l'évolution vers le même mode de vie, elles le font grâce aux mêmes changements génomiques ou avec des changements différents. Dans notre cas, il s'agit de l'adaptation au mode de vie en milieu désertique chez différents rongeurs, qui implique notamment des changements de morphologie et de physiologie du rein. Nous recherchons systématiquement des changements de séquences protéiques et d'expression associés au passage à ce mode de vie chez une espèce

désertique versus une espèce contrôle. En complément à cela, nous souhaitons caractériser les gènes dont l'expression répond à un stress hydrique dans différentes espèces de rongeurs. Ces gènes sont-ils aussi ceux sélectionnés au cours de l'évolution? Sont-ils les mêmes dans des espèces mésiques et des espèces désertiques?

Le projet adressant une question de physiologie rénale, la réponse transcriptionnelle d'un organe complexe à un challenge hydrique n'est pas possible *in vitro*.

Pour cela, nous appliquerons un protocole de restriction hydrique publié chez la souris à 4 espèces de rongeurs de laboratoire que nous manipulons couramment : une espèce mésique (souris, *Mus musculus*), une espèce adaptée à la sécheresse (hamster doré, *Mesocricetus auratus*), une espèce désertique (souris épineuse, *Acomys dimidiatus*) et une espèce de désert très aride (gerbille, *Meriones unguiculatus*). A l'issue de l'expérimentation, les animaux seront mis à mort pour récupérer leurs organes, notamment le rein, et générer des données d'expression par RNAseq.

Le projet fera appel à 12 mâles souris, 12 mâles hamster, 12 mâles souris épineuse et 12 mâles gerbilles (à chaque fois, 6 en restriction hydrique, 6 en conditions normales), de façon à garantir l'obtention de données d'expression au minimum en triplicat pour chaque condition, et à caractériser des gènes répondant au stress hydrique de façon robuste dans chaque espèce : surexpression ou sous-expression.

Le projet adressant une question de physiologie rénale, la réponse transcriptionnelle d'un organe complexe à un challenge hydrique, il n'y a pas de possibilité de remplacement. Cependant, nous avons choisi un protocole de restriction (et non de privation) hydrique, pour rester dans des conditions physiologiques proches de conditions naturelles et aussi limiter la souffrance des animaux. Des points limites seront mis en place pour limiter toute souffrance éventuelle.

9736 L'activité des cellules excitables (de type : cellules nerveuses, musculaires, cardiaques ou cellules endocriniennes) est directement liée à l'existence d'une différence de potentiel électrique entre le milieu intracellulaire et le milieu extracellulaire. Les charges électriques dont il est question ici sont apportées par des particules, appelées des ions, qui se trouvent en solution dans les milieux biologiques et qui se répartissent inégalement de part et d'autre des membranes des cellules. Qu'ils soient chargés positivement ou négativement, ces ions ne peuvent traverser les membranes lipidiques sans la présence de grosses molécules appelées Canaux Ioniques. Ces canaux ioniques sont des protéines qui constituent, dans ces barrières hydrophobes, un espace hydrophile permettant le passage de ces ions. Le mouvement de ces derniers (direction et force de déplacement) est alors guidé par des lois physicochimiques similaires à celles que l'on trouve dans une solution aqueuse.

En permettant le passage de ces particules chargées de part et d'autre des membranes, ces canaux ioniques contribuent aux changements de potentiels électriques nécessaires à la fonction de la cellule excitable (propagation d'un potentiel d'action, transmission synaptique, contraction musculaire ou encore : libération d'hormones).

Avec la découverte régulière de nouveaux canaux ioniques, la liste de ces derniers ne cesse de s'allonger et on compte aujourd'hui plus de 300 protéines différentes dans cette super famille. Pour étudier les propriétés électrophysiologiques ou pharmacologiques de ces protéines et pour comprendre comment leurs fonctions sont contrôlées dans la cellule, ces canaux sont exprimés dans des systèmes hétérologues tels que des lignées cellulaires ou les ovocytes de *Xenope*. Ces deux systèmes d'expression sont complémentaires et chacun présente des avantages et des inconvénients qui justifient leur utilisation en parallèle. Les lignées cellulaires présentent, par exemple, l'avantage de pouvoir visualiser l'expression membranaire d'un canal même lorsque celui-ci n'est pas fonctionnel et en l'absence de courants électriques, ce que ne permet pas un œuf de *Xenope*. Inversement, l'injection de quantités mesurées d'ARN codant dans un œuf de *Xenope* permet d'exprimer simultanément plusieurs protéines recombinantes et d'en contrôler les niveaux relatifs d'expression ce qui n'est pas possible dans les lignées de cellules.

L'utilisation des œufs de *Xenopes* permet également de réaliser un nombre considérable d'enregistrements en comparaison du faible rendement atteint avec les lignées cellulaires. Dans ce contexte, l'utilisation des œufs de *Xenopes* assure une valeur statistique plus forte aux études de pharmacologie et de caractérisation biophysique des canaux ioniques. En outre, l'ovocyte est

actuellement considéré comme le meilleur système pour réaliser des études de structure/fonction sur les canaux ioniques. Il nous a permis par exemple d'identifier plusieurs inhibiteurs de canaux ioniques actuellement brevetés pour leurs effets analgésiques et pour leur fort potentiel neuro-protecteur.

Pour réaliser nos expériences sur l'ovocyte de Xenope, nous sommes amenés à euthanasier sous anesthésie 1 à 2 individus femelles par semaine afin d'en recueillir les sacs ovariens. Chaque individu fournit deux sacs que nous maintenons dans un milieu permettant leur utilisation sur plusieurs jours. Toutefois, et malgré l'utilisation de ces ovocytes par deux équipes de notre institut, la quantité d'œufs disponible est largement supérieure à nos besoins et l'équivalent d'un sac ovarien est généralement inutilisable après plus de 5 jours de stockage.

Remplacer : L'utilisation des ovocytes, et par conséquent l'euthanasie de Xenopes, reste limité grâce à l'utilisation systématique de lignées cellulaires lorsque, dans ce système hétérologue, les conditions d'enregistrements sont au moins aussi avantageuses que celles des ovocytes. En outre, chaque fois que cela est possible, nous utilisons la simulation informatique et la modélisation de la structure des protéines pour réduire le nombre d'expériences.

Réduire : L'objet de cette demande d'autorisation de projet est de pouvoir réduire le nombre d'animaux utilisés en pratiquant sur le même animal deux opérations chirurgicales espacées de quelques semaines. Celle-ci permettrait de pratiquer une ovariectomie unilatérale suivie d'un réveil de l'animal et d'une mise au repos en vue d'une seconde opération quelques semaines plus tard. Le même animal serait ainsi prélevé deux fois avant d'être euthanasié ce qui n'est pas le cas actuellement. Toujours dans l'objectif de réduire le nombre d'animaux, nous avons acquis un robot injecteur ainsi qu'un « Roboocyte » qui permet d'injecter l'ADN ou l'ARN codant les canaux ioniques - ou leurs protéines régulatrices - et de mesurer automatiquement les courants ioniques correspondants. L'automatisation de nuit et le nombre important d'enregistrements devraient mieux rentabiliser un lot d'ovocytes et donc réduire le nombre de Xenopes à prélever et à euthanasier pour arriver au même résultat scientifique.

Raffinement : afin d'éviter toute souffrance ou angoisse aux animaux, nous mettrons en œuvre tous les éléments de raffinement nécessaires, notamment anesthésie/analgésie lorsque cela est requis. Nous nous servirons de fiches de suivi incluant des grilles de scores. Ces grilles de scores contiennent des points limites précis, clairs et adaptés à nos expérimentations. La mort n'étant pas un point limite acceptable, nous sortirons les Xenopes de l'étude lorsqu'un des points limites sera atteint. 120 xénopes seront utilisés pour ce projet.

9737 Rechercher un stimulus pertinent dans un environnement complexe est une tâche complexe mais indispensable à notre survie. Cela nécessite de comparer ce que l'on regarde à ce que l'on recherche (prérequis contextuel). Cette comparaison repose sur l'interaction d'un grand nombre de processus neuronaux incluant l'extraction d'informations sensorielles ainsi que des processus cognitifs tels l'attention visuelle sélective ou la prise de décision.

Chez les primates, les caractéristiques visuelles (traits) sont extraites dans les aires corticales occipitales. Par exemple, les neurones de l'aire V4 sont sélectifs à l'orientation et la couleur. Toutefois, la quantité d'information présente dans une scène visuelle est trop importante pour que le cerveau les traite rapidement et effectivement. Le rôle de l'attention est de sélectionner les informations en fonction de leur pertinence comportementale en renforçant le traitement des traits pertinents. Ainsi, si nous savons que notre amie porte une chemise rouge et un chapeau melon, le cerveau traitera en priorité les stimuli rouges et de forme arrondie. Ces modulations attentionnelles ont pour origine des signaux en provenance du cortex préfrontal. Toutefois, la nature exacte de ces signaux et leur mode d'interaction avec les neurones du système visuel restent inconnus.

De plus, chacun des traits visuels basiques (direction du mouvement, couleur...) est encodé par des populations de neurones différentes. Hors, il est rare que nous recherchions un seul trait visuel particulier. Il est donc nécessaire de regrouper toutes les représentations pertinentes de manière à encoder une représentation unitaire des stimuli visuels. Décider de la pertinence d'un stimulus nécessite donc de comparer ces représentations de ce que l'on regarde à une représentation interne du stimulus recherché. Cela implique que les signaux sensoriels ascendants, filtrés au préalable par l'attention visuelle, et les signaux cognitifs soient intégrés et comparés. Le cortex

pariétal est un candidat parfait pour effectuer cette comparaison. Ses neurones intègrent en effet ces 2 types de signaux : 1) les signaux sensoriels représentant uniquement l'identité des stimuli observés. 2) un signal descendant représentant l'identité du stimulus recherché. De plus, une sous population différente de neurone du cortex pariétal répond uniquement lors de la détection des stimuli visuels, participant ainsi à la prise de décision.

Ces processus sensoriels et cognitifs (extraction des traits visuels, attention sélective), encodés et contrôlés par au moins 3 aires corticales différentes (cortex visuel occipital, cortex préfrontal et cortex pariétal) interagissent dans le but de faciliter la prise de décision. Ce projet cherche à répondre aux questions soulevées par ce cadre théorique :

- 1) Comment différents stimuli recherchés sont encodés par les neurones du cortex frontal.
- 2) Comment ces représentations internes sont transformées en signaux attentionnels descendants capables de filtrer les signaux ascendants représentant les informations visuelles pertinentes.
- 3) Comment les informations sensorielles (ce que l'on regarde) et cognitives (ce que l'on recherche) sont intégrées, combinées et transformées en une décision par les neurones pariétaux.

Je propose d'entraîner deux macaques Rhésus (*Macaca mulatta*) à effectuer une tâche comportementale nécessitant la manipulation de l'attention visuelle et la prise de décision. J'enregistrerai simultanément l'activité de larges populations de neurones des cortex pariétal, frontal et occipital. Cette approche permettra de caractériser et modéliser les flux d'informations entre chaque aire corticale. Ce projet pionnier, focalisé sur les interactions cortico-corticales et sur les liens causaux entre l'activité neuronale et les performances comportementales, permettra de définir un nouveau cadre théorique du contrôle neuronal des capacités cognitives. Cela devrait être du plus grand intérêt pour les scientifiques et cliniciens impliqués dans l'étude des fonctions cognitives de haut niveau.

Le bien-être des animaux, le niveau de stress et leur santé seront suivis par une équipe d'animaliers et de vétérinaires spécialisée dans le suivi des PNH. Ces procédures (d'un niveau de sévérité allant de léger à modéré) sur une durée de 5 ans (de l'acquisition des animaux à la publication des résultats) répondent aux impératifs liés à la règle de 3Rs. Remplacement : Ce projet s'intéresse à des capacités cognitives et sensorielles complexes. Il nécessite la réalisation de tâches comportementales que seuls les primates sont capables d'apprendre dans un délai convenable (6 à 12 mois) pour la réalisation d'un tel projet scientifique. Les macaques Rhésus sont le modèle animal privilégié pour les approches électrophysiologiques des processus cognitifs pour plusieurs raisons. Aux vues des techniques d'investigation de l'activité corticale, acquérir l'activité unitaire de populations de neurones ne peut être réalisé que par des approches invasives, interdisant l'expérimentation chez les humains et les hominidés. De plus, il n'est pas possible, à notre connaissance et contrairement aux macaques Rhésus, d'entraîner des primates plus petits (tels les marmousets) ou des rongeurs, à effectuer de telles tâches comportementales. Qui plus est, contrairement aux rongeurs, ceux sont des animaux diurnes, dont le système nerveux visuel et les capacités attentionnelles sont très proches de celles des humains. Du coup, l'impact de ces recherches sur notre connaissance du système nerveux humain est direct. Raffinement : Contrairement à la majorité des études sur le singe, qui s'intéressent au fonctionnement d'une ou deux aires corticales, nous enregistrerons simultanément dans 3 aires corticales différentes, réduisant ainsi le stress lié à chaque procédure expérimentale. Réduction : Nous utiliserons le nombre minimum d'animaux (N=2) nécessaire à la validation statistique de nos expériences.

9738 Parmi les filières de production animale, la filière porcine est soumise à une concurrence particulièrement forte au sein de l'Union Européenne, de même qu'avec les autres bassins de production mondiaux. Dans ce contexte, la maîtrise des coûts constitue un enjeu majeur et constant pour la filière. L'aliment représentant jusqu'à 69% des coûts de production, l'amélioration de l'efficacité alimentaire constitue donc un des leviers d'action important pour améliorer la compétitivité des élevages porcins. Outre ces aspects de compétitivité, la filière porcine est également interrogée par la société sur ses impacts environnementaux, l'usage des médicaments et le bien-être animal. Son acceptabilité et sa durabilité passent donc par des améliorations sur ces différents plans. L'élevage de précision semble être une voie prometteuse pour répondre à ces enjeux. Ce concept peut être défini comme le pilotage de l'élevage grâce au suivi automatisé et en

temps réel de la production, de la reproduction, de la santé et du bien-être des animaux. L'objectif est d'améliorer les performances économiques, sociales et environnementales de l'élevage par une meilleure gestion du troupeau en prenant notamment en compte les besoins individuels des animaux. Dans ce contexte d'élevage de précision, l'alimentation de précision est une technique en développement qui permet l'ajustement dynamique le plus fin possible des apports nutritionnels (en quantité et en qualité) aux besoins des porcs, afin d'améliorer l'efficacité alimentaire tout en diminuant le coût et les rejets notamment d'azote et de phosphore. L'application de ce concept nécessite de mesurer la réponse des animaux à l'alimentation (poids, consommation d'aliment), de traiter ces données pour définir les besoins des animaux et la composition de l'aliment à distribuer pour répondre à ces besoins sans excès, et des dispositifs techniques permettant de distribuer en temps réel ces aliments.

Un outil d'aide à la décision a été développé pour le porc en croissance pour traiter les données individuelles des animaux, déterminer en fonction des performances de chaque porc la composition de l'aliment à lui distribuer chaque jour, et piloter un distributeur d'aliment capable de distribuer un aliment spécifique pour chaque animal. L'objectif de ce projet est de tester l'application de l'outil d'aide à la décision en conditions pratiques sur 480 porcs suivis durant toute la période de croissance-finition. Les calculs utilisés dans l'outil doivent en effet être testés en condition réelle pour être ensuite affinés et permettre un ajustement le plus fin possible des apports alimentaires aux besoins des animaux. L'hypothèse est que l'alimentation de précision va permettre de réduire le coût alimentaire et les nutriments utilisés tout en maintenant les performances des animaux. Au cours des 4 répétitions prévues, l'application de l'alimentation de précision (avec à chaque répétition une amélioration de l'outil testé) sera comparée à la pratique habituelle qui consiste à distribuer un aliment identique à tous les animaux, avec un premier aliment jusqu'à 65 kg de poids moyen du groupe et ensuite un deuxième aliment moins riche en nutriments.

Le projet a été élaboré dans le respect de la règle des 3R. Remplacement : les mesures sur animaux sont requises car l'objectif de l'étude est de mesurer les réponses des porcs à leur alimentation. Ces travaux ne peuvent se faire autrement que sur un animal entier et vivant. Les données générées dans ce travail seront ensuite utilisées pour améliorer l'outil actuel. Raffinement : cette expérimentation est réalisée dans une salle avec des équipements (station d'alimentation automatique, système de pesée automatique) permettant de mesurer les performances individuelles d'animaux élevés en un seul groupe en conditions proches de celles rencontrées pratiquement en élevage. Réduction : le nombre d'animaux dans chaque répétition (120) et le dispositif expérimental mis en place ont été déterminés sur la base d'essais antérieurs et permet d'atteindre le niveau de précision souhaité pour évaluer avec précision les effets de l'alimentation malgré la forte variabilité interindividuelle généralement observée dans ce type d'étude.

9739 Nous souhaitons transmettre à de jeunes chercheurs les toutes dernières connaissances concernant le développement du cortex cérébral chez les mammifères. L'étude du développement du système nerveux central est en effet primordial pour mieux comprendre les pathologies qui y sont associées. Le développement anormal du système nerveux peut-être à l'origine de troubles psychiatriques (autisme, schizophrénie, syndrome de l'X fragile), de troubles moteurs, de l'apprentissage, du langage ou encore de pathologies périphériques telles l'obésité, l'infertilité, etc. Une meilleure connaissance de ces différentes pathologies passe donc par une étude approfondie des mécanismes à l'origine du développement cérébral.

La session de formation propose à la fois des conférences par des chercheurs reconnus comme spécialistes dans ce domaine et des enseignements pratiques pour apprendre à maîtriser les nouvelles techniques utilisées dans le cadre des études sur le développement du cerveau.

Lors du développement cérébral certaines cellules du cerveau vont se multiplier, migrer d'une partie à l'autre du cerveau et établir de nouvelles connexions entre elles. Afin d'étudier ces phénomènes, certaines cellules du cerveau de l'embryon seront marquées par injection in utero chez des femelles gestantes. Quelques jours après l'injection, les embryons seront euthanasiés, leurs cerveaux seront prélevés et analysés afin d'étudier plus précisément la division et la migration des cellules marquées.

Ces projets permettront d'étudier le rôle distinct de différentes catégories de cellules présentes dans le cerveau et en particulier leur capacité à se déplacer au sein du cerveau et à établir des communications entre elles. Ces études sont impossibles à réaliser à l'aide de cultures cellulaires pour plusieurs raisons : en général les cultures ne permettent d'observer qu'un seul type cellulaire et nous souhaitons étudier les interactions entre plusieurs types cellulaires, nous souhaitons également étudier la migration des cellules au sein du cerveau et il n'existe pas à l'heure actuelle de modèle *in vitro* permettant de modéliser la complexité de structure et de fonctionnement de cet organe

Nous utiliserons dans ce but d'enseignement des souris qui nous seront fournies par un éleveur agréé.

Pour l'ensemble du projet, un nombre global de 17 femelles gestantes sera nécessaire. Nous avons soigneusement choisi les paradigmes expérimentaux (électroporation *in utero* de souris non transgéniques, injection intra nasale chez l'embryon) pour réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. Afin de respecter la règle des 3R, nous avons étudié avec minutie notre projet. Nous avons réduit au maximum le nombre d'animaux, nous avons raffiné nos techniques de chirurgie et nous avons recours à l'animal car nous considérons qu'il est impossible de modéliser ce que nous souhaitons apprendre à nos étudiants. Ainsi :

i) il nous est nécessaire de montrer les techniques puis de les faire pratiquer par les étudiants, nous ne pouvons donc pas travailler avec moins d'animaux ;

ii) les méthodologies utilisées dans ce projet impliquent la mise en œuvre de toutes les stratégies expérimentales et pharmacologiques disponibles actuellement pour réduire le nombre d'animaux utilisés mais aussi minimiser les possibles effets délétères pour ceux-ci, avec un respect particulier de la notion de points limite (critères d'interruption en cas de souffrance des animaux) ;

iii) le projet a pour but de former les étudiants afin qu'ils soient en mesure de réaliser au mieux les procédures qu'ils auront apprises et transmettre ainsi ces techniques dans leur laboratoire d'origine. Une meilleure connaissance des techniques enseignées leur permettra de réduire le nombre d'animaux opérés lorsqu'ils voudront réaliser ces techniques pour les besoins de leur recherche

9740 La luzerne déshydratée est peu utilisée aujourd'hui en alimentation équine en France. Ceci est dû en partie au peu de données scientifiques existantes sur les intérêts de la luzerne déshydratée pour l'alimentation et la santé des chevaux. Or la luzerne a un pouvoir tampon intrinsèque fort, ce qui pourrait limiter le risque d'apparition de certaines maladies digestives liées à l'alimentation. Le présent projet vise à mener une étude *in vitro* sur l'effet de différentes luzernes déshydratées sur les écosystèmes de l'estomac et des fèces des chevaux. Cette étude *in vitro* permettra de cibler le produit dont les caractéristiques sont les plus intéressantes pour la santé des chevaux. Elle est conduite dans le but de diminuer le nombre d'animaux nécessaires dans les prochaines études *in vivo*.

Pour réaliser cette étude *in vitro* il est nécessaire d'obtenir des inocula gastriques et fécaux sur des chevaux en bonne santé. Les animaux inclus dans l'étude sont six hongres Trotteurs Français adultes. Un prélèvement de contenu gastrique via une sonde nasogastrique est réalisé sur trois chevaux et un prélèvement de fèces par fouille rectale est effectué sur les trois autres, après une semaine où ces chevaux sont tous conduits de la manière. L'utilisation de trois chevaux pour chaque type de prélèvement permet d'obtenir un inoculum homogène et représentatif d'une population soumise aux mêmes conditions pour le test *in vitro*.

Chaque jour les chevaux vont au paddock en groupe et ils sont exercés au marcheur quotidiennement. Ceci permet de respecter leur bien-être.

Au quotidien, le personnel animalier observe le comportement de chaque cheval le matin au moment de la distribution du repas afin de repérer les signes de mal-être ou de souffrance. Ces signes inhabituels sont immédiatement signalés au responsable de l'expérimentation.

Les chevaux qui présenteraient des signes de mal-être ou de souffrance seront soignés et si jugé nécessaire par le vétérinaire traitant retirés de l'essai.

9741 L'accès à un parcours extérieur pour les animaux est une obligation réglementaire en élevage avicole biologique. Ce type de production répond à une demande de la société qui décrit souvent

les élevages en claustration. Le parcours contribue notamment à un bien-être animal car il apporte un confort physique à l'animal, enrichit son milieu et permet l'expression de certains comportements naturels propres à l'espèce. Cependant, il a été observé que l'utilisation par les poulets de la partie parcours est très hétérogène et souvent faible. Cette sous-utilisation du parcours a très certainement une origine multifactorielle et a une incidence sur la durabilité du système d'élevage avec notamment la mauvaise répartition des déjections sur le parcours. Cependant, avec une bonne gestion des parcours, notamment par des aménagements, il peut devenir un véritable atout. L'objectif de ce projet est d'étudier le comportement exploratoire des poulets sur les parcours et d'évaluer l'influence de différents facteurs/aménagements sur cette activité. Pour assurer un suivi individuel du déplacement des poulets, les animaux seront identifiés avec des systèmes différents faisant l'objet de 2 procédures : identification à l'aide de « ponchos » et/ou de puces électroniques RFID. L'étude prévoit un suivi maximum de 8 000 poulets de chair sur 5 ans (2 bandes de 800 animaux/ an). Le remplacement n'est pas possible car l'objet de l'étude est l'animal dans son milieu d'élevage. La réduction est prise en compte car le nombre d'animaux est limité au minimum pour avoir un échantillon suffisamment représentatif du comportement du lot et permettant l'identification d'animaux avec un comportement extrême : casanier vs explorateur. Le raffinement consiste à poser le système d'identification de manière à ne pas entraver la liberté de mouvement des animaux et de placer les animaux en condition d'élevage biologique avec accès à un parcours qui offre un milieu riche.

9742 Les synucléinopathies est le terme regroupant différentes maladies neurodégénératives humaines dont la maladie de Parkinson (MP), les démences à corps de Lewy et l'atrophie multisystémisée. 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. Nous avons développé un test de criblage précoce sur cultures primaires de neurones de souris C57BL6/J exposés à des assemblages de synucleine exogène. Ce test vise à (i) reproduire in vitro les phénomènes initiateurs de la transmission et de la propagation spatiale de la synucleinopathie qui sous-tendent la MP et (ii) servir de base d'identification des points de contrôle possibles de cette pathologie agrégative.

La mise en œuvre d'un tel test permet d'évaluer « en batterie » un grand nombre d'hypothèses mécanistiques ainsi que de composés, à une échelle irréalisable chez l'animal. Cependant, afin de valider la pertinence physiopathologique du test, il est tout d'abord nécessaire de déterminer si les phénomènes moléculaires élémentaires mesurés dans ce dernier ont effectivement lieu ou pas in vivo, au sein de régions exposées artificiellement à des agrégats de synucleine exogène. Nous devons donc le faire in vivo chez des animaux à un âge proche de celui des cultures de neurones, c'est-à-dire à P0 chez lesquels des injections stéréotaxiques seront faites pour injectés des agrégats de synucleine exogène. Pour ce faire, 6 portées de 8 nouveaux nés seront utilisées soit 48 animaux. Dans le respect du R de réduire, ce nombre de souris est établi pour obtenir une puissance statistique suffisante lors de l'étude. Dans le respect du R de remplacer, la validation de notre hypothèse nous permettra d'utiliser pour un projet complexe, un modèle in vitro de culture de neurones. 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. Des points limites suffisamment précoces seront utilisées pour éviter toute souffrance.

9743 L'hypoxie intermittente (HI), induite par les apnées du sommeil, conduit à des altérations de la sensibilité à l'insuline et de l'homéostasie glucidique. De plus, le développement de la stéatopathie hépatique (NASH), favorisée par les mêmes mécanismes que l'insulinorésistance (inflammation, stress oxydant, lipotoxicité) semble être facilité par la présence d'un Syndrome d'Apnée du Sommeil (SAS). A ce jour, il n'y a pas de traitement efficace pour prévenir la NASH alors que sa prévalence augmente considérablement. Les mécanismes impliqués dans cette synergie délétère du SAS et de l'insulinorésistance restent mal connus.

Nous faisons l'hypothèse qu'une dysfonction mitochondriale pourrait en être l'élément central. L'objectif de ce travail est donc d'étudier les effets et les conséquences d'une exposition chronique à l'HI dans un contexte d'obésité induite par régime enrichi en gras et en sucrose sur l'homéostasie glucidique et la NASH, en recherchant une altération du fonctionnement mitochondrial.

Pour cela nous proposons d'exposer des souris obèses (sous régime enrichi en gras et sucrose pendant 16 semaines) à l'hypoxie intermittente pendant 6 semaines et d'analyser dans le détail la fonction mitochondriale hépatique (respiration, productions radicalaires).

Les animaux seront répartis en 8 groupes. La moitié d'entre eux suivront un régime enrichi en gras et en sucrose, l'autre moitié suivra un régime standard. Les animaux de chacun des deux groupes seront à nouveau répartis en 2 autres groupes : la moitié d'entre eux seront exposés à l'hypoxie intermittente, l'autre moitié sera exposée à la normoxie (groupe contrôle). Dans chacun de ces groupes la moitié de animaux seront traités par un placebo ou par de la metformine (antidiabétique de référence).

Au terme des 6 semaines d'exposition à l'hypoxie, les animaux seront euthanasiés pour prélever différents organes dont le foie, le tissu adipeux et le cœur. Sur le foie, nous réaliserons des analyses histologiques ainsi qu'une extraction des mitochondries permettant une analyse fine de leur fonctionnement (consommation d'oxygène, production de radicaux libres etc.). Les autres organes seront congelés et stockés pour des analyses à postériori.

Le nombre d'animaux a été évalué avec un test statistique tenant compte de la variabilité des précédentes expériences déjà réalisées en ce qui concerne les analyses de fonction mitochondriale et en intégrant un effet de l'hypoxie à hauteur de 20-30%. Nous obtenons un minimum de 10 animaux par groupe avec un risque de 5%. Avec les mises au point d'expérimentations, nous prévoyons d'utiliser 15 animaux par groupe soit 120 animaux.

D'autres organes dont les muscles des animaux seront mis à disposition d'autres membres du laboratoire pour des extractions de mitochondries et des tests sur celles-ci.

Nous avons pris en compte la règle des 3 R car ces expérimentations sont faites avec soucis de remplacer l'expérimentation animale. Seulement à ce jour aucun moyen ne nous permet de remplacer ce modèle animal pour analyser la fonction mitochondriale dans un contexte de dysfonction métabolique. Par contre, nous réduisons le nombre d'expérience en multipliant les tests sur une même préparation de mitochondries à partir d'un seul animal. Nous raffinons aussi l'expérimentation grâce à la même stratégie à savoir une multitude d'analyses sur un même animal en partageant les organes. Une surveillance des animaux sera faite avec la mise en place de points limites prédéfinis.

A terme, l'objectif est d'identifier une cible thérapeutique (mitochondriale) permettant de limiter les effets délétères de l'hypoxie intermittente sur l'insulinorésistance et la NASH.

9744 En France, environ 60% des porcs en croissance sont alimentés deux fois par jour par des dispositifs de machine à soupe. Ces équipements reconstituent une soupe à partir d'aliment (sous forme de farine) et d'eau, et distribuent ensuite cette préparation à des cases de porcs via des tuyauteries qui parcourent l'ensemble des salles d'élevage hébergeant des animaux de différents poids vifs. Le plus souvent, les animaux reçoivent un aliment unique du début à la fin de leur croissance, alors qu'il est connu que leurs besoins en protéines (exprimés en concentration de l'aliment) diminuent lorsque le poids vif augmente. Les équipements actuels ne permettent pas de distribuer avec précision des soupes de composition différente aux animaux en fonction de leur poids. Plutôt que de distribuer deux fois par jour une soupe de composition variable en fonction du poids vif des animaux, il serait possible de distribuer au cours d'un repas un aliment à forte teneur en protéines, et au cours du repas suivant un autre aliment à faible teneur en protéines. En pondérant la part de chaque aliment au cours de la journée en fonction du poids des porcs, il serait donc possible d'alimenter les animaux en fonction de leurs besoins. En pratique, cela reviendra à dissocier au cours de la journée les apports de protéines et d'énergie.

Afin de développer cette nouvelle stratégie d'alimentation en adéquation avec les besoins des animaux, le projet vise à tester l'effet de la dissociation des apports de protéines et d'énergie sur la croissance et le dépôt de protéines des porcs en croissance. Le projet sera conduit sur 18 porcs en croissance pour mesurer la croissance, la consommation individuelle d'aliments et le dépôt de

protéines par différence entre les quantités ingérées et excrétées dans les fèces et les urines. Le projet a recours au porc qui est l'espèce-cible de l'étude et qui ne peut pas être remplacé par un autre modèle expérimental. Le projet est élaboré dans le respect de la règle des 3R :

- Remplacement : le projet nécessite d'avoir recours à des expérimentations animales car il n'existe pas de modèles décrivant les phénomènes biologiques que nous souhaitons étudier.

- Réduction : le nombre d'animaux et le dispositif expérimental mis en place ont été déterminés sur la base d'essais antérieurs afin de mesurer les critères d'intérêt avec une précision suffisante tout en limitant le nombre d'animaux.

- Raffinement : afin de limiter l'hébergement en cage à digestibilité limitant les mouvements de l'animal, les animaux seront d'abord hébergés dans des cages leur permettant de se retourner. Les cages seront placées de façon à permettre un contact visuel, sonore, olfactif et tactile entre les animaux.

9745 La viande de volaille représente une source de protéine animale importante et en augmentation dans l'alimentation de l'homme en France et est pour partie importée. La production française se fait avec du tourteau de soja importé (3.5 millions de tonnes majoritairement OGM) et des céréales. Dans le cadre du plan protéine 2014/2020 mis en place par le ministère en charge de l'agriculture, plusieurs projets de recherche ont été construits, pour améliorer l'autonomie de la France. Ces projets visent plusieurs objectifs : 1) développer une production nationale de produits tracés et non OGM à substituer au tourteau de Soja, essentiellement à base de graines oléoprotéagineuses, 2) réduire les gaspillages alimentaires en distribuant aux animaux des coproduits des industries agro-alimentaires 3) Améliorer l'efficacité alimentaire par une meilleure connaissance des processus digestifs et du microbiote.

L'évaluation de la valeur nutritionnelle et de la réponse animale chez les espèces cibles est l'objet de ce projet, la méthode des bilans digestifs chez le poulet étant la référence. Au cours des 3 années du projet, en regroupant différents programmes de recherche, nous prévoyons de réaliser au maximum 15 séries de bilans (1 série correspondant à 120 bilans), soit au maximum 1800 animaux. Le remplacement n'est pas possible car il n'existe à ce jour aucune technique in vitro pour apprécier la valeur nutritionnelle des aliments par espèce.

La réduction est prise en compte : le nombre d'animaux est limité au minimum statistique requis. Des techniques in vitro seront utilisées en parallèle (spectrométrie infrarouge) pour incrémenter une base de données et limiter le recours à l'animal dans le futur.

Le raffinement consiste d'une part à réduire le temps de séjour en cages à bilan des animaux (3 jours d'adaptation et 3 jours de bilan), en travaillant sur des régimes alimentaires aussi équilibrés que possible pour éviter les dérèglements digestifs, en réalisant les bilans à 3 semaines d'âge, et dans des cages grillagées sur les 4 côtés permettant le plus possible aux animaux de se voir et d'échanger. Par ailleurs en groupant pour des séries importantes plusieurs programmes de recherche, le nombre de témoins est réduit et il est possible de relier les matières premières entre elles sans expérimentation supplémentaire, ce qui améliore la robustesse des tables d'alimentation.

9746 La première naissance vivante d'un enfant en bonne santé après une transplantation utérine (TU) a été réalisée en Suède en 2014. Cet événement mondial a suscité un énorme espoir pour les patientes atteintes d'infertilité utérine absolue (IU), très souvent dans un contexte d'agénésie congénitale. Ce premier succès (et les 5 suivants) a été développé avec un utérus issu d'une donneuse vivante. La difficulté dans un contexte de donneuse vivante est la chirurgie longue (11 heures) avec un contexte de risque chirurgical non négligeable pour l'uretère. Les enjeux actuels de la TU avec donneuse vivante sont donc de pouvoir simplifier la technique pour diminuer les temps opératoires du prélèvement utérin et de minimiser les risques de plaie urétérale. L'une des possibilités pour atteindre ces deux objectifs est d'utiliser un autre retour veineux de l'utérus que les veines utérines, sans compromettre la vascularisation de l'utérus à greffer, notamment ne pas faire apparaître un état congestif du greffon le rendant impropre à la nidation d'une grossesse. Ce retour veineux alternatif aux veines utérines est le retour veineux ovarique (ou pédicule lombo-ovarien). L'objectif de ce travail est de valider l'hypothèse que le retour veineux ovarique est suffisant au drainage utérin dans le cadre de la TU sur un modèle animal porcin. Le projet implique 18 porcs.

La nature même du projet exige le recours à un animal vivant. Pour valider l'efficacité de la procédure de transplantation, nous faisons principalement appel à des méthodes non invasives (imagerie IRM, imagerie TEP ultrasonographie) afin de réduire l'inconfort de l'animal. De plus, la même anesthésie sera mise à profit pour mettre en place plusieurs méthodes d'investigation afin de réduire le nombre de procédures sur le même sujet.

9747 Le microbiote intestinal est aujourd'hui considéré comme un facteur clé dans la pathogenèse de maladies chroniques telles que l'obésité et le diabète de type 2. Le microbiote module les systèmes biologiques de l'hôte qui contribuent au contrôle de l'homéostasie énergétique, du métabolisme du glucose et de l'inflammation en agissant principalement sur la fonction barrière de l'intestin. Il joue un rôle clé dans le développement de l'inflammation de faible intensité caractéristique de ces maladies métaboliques. De nombreuses études ont montré que la fonction barrière de l'intestin était altérée en cas d'obésité et pourrait favoriser le développement du phénomène inflammatoire. Notre projet vise à identifier et caractériser de nouveaux acteurs permettant de moduler directement la perméabilité intestinale et l'inflammation dans un contexte physiopathologique. Pour étudier les relations entre perméabilité intestinale et inflammation, seule une approche intégrée par l'expérimentation animale, mimant le développement de l'obésité, est envisageable et ne peut être substituée par des analyses réalisées uniquement *in vitro*. Dans ce projet, nous utiliserons différentes lignées de souris génétiquement modifiées dont le phénotype n'est pas dommageable. Le nombre de souris utilisées sera de 960. Notre projet met en jeu l'administration de substances pharmacologiques pour valider *in vivo* des cibles thérapeutiques préalablement identifiées par des études *in vitro*. Pour respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum permettant une analyse statistique efficace des résultats d'après nos données antérieures. Des méthodes alternatives de culture cellulaire seront utilisées pour étudier les mécanismes moléculaires sous-jacents. De plus, afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligée aux animaux, une surveillance journalière des animaux sera réalisée en respectant des points limites bien définis. A terme, les résultats de ce projet permettront le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour prévenir et traiter l'obésité et ses complications.

9748 La consommation de viande rouge et de charcuteries est associée à une augmentation du risque de cancer du côlon. La viande rouge est classée comme cancérigène probable par l'OMS. Les données épidémiologiques humaines ont été confirmées par des études expérimentales à l'aide de modèles animaux qui ont permis de déterminer les mécanismes impliqués : le fer sous forme hémique qui est présent en grande quantité dans la viande rouge est proposé comme le principal responsable de cet effet promoteur, en raison de sa capacité à fortement oxyder les lipides du régime alimentaire, ce qui aboutit à la formation de composés toxiques. Les études *in vivo* réalisées jusqu'à présent en donnant chaque jour du fer hémique ont montré qu'en parallèle de l'effet promoteur du fer hémique sur la cancérogenèse colique, on observait une augmentation des défenses antioxydantes au niveau du côlon. Ces défenses permettent à l'organisme de limiter les dégâts occasionnés par le fer hémique et les produits d'oxydation des lipides. Le but du présent projet est d'étudier l'effet d'une administration intermittente du fer hémique et du HNE sur le développement de lésions précancéreuses d'une part et sur les défenses antioxydantes coliques d'autre part. Notre hypothèse est que ces composés sont plus toxiques lorsque les défenses antioxydantes ont le temps de revenir à un niveau basal. Nous utiliserons un modèle animal classiquement utilisé pour étudier la relation aliment/cancer (un total de 93 rats Fisher F344 males de 5 semaines seront utilisés dans le respect du principe des 3R) qui recevra dans l'alimentation du fer hémique ou du HNE et nous étudierons l'effet de cette administration chronique (3 mois) mais intermittente (fréquence à déterminer lors d'une expérimentation préalable) sur la modulation des biomarqueurs précoces de cancérogenèse, sur les défenses antioxydantes coliques et sur les biomarqueurs fécaux et urinaires de peroxydation. Cette expérimentation sans prélèvement sur les animaux hors fèces et urines sera conduite dans le respect de la règle des trois R : le nombre des animaux est réduit au maximum pour toutefois maintenir une puissance statistique suffisante ; les conditions expérimentales seront strictement contrôlées (identification de points limites précoces comme critères d'interruption et injection intra-péritonéale avec une solution préalablement

tamponnée) éviteront toute douleur/souffrance animale. Les rats seront hébergés dans des locaux d'animalerie conventionnels, avec un enrichissement de l'habitat en cages collectives permettant l'interaction entre congénères, leur assurant les meilleures conditions de vie et de bien-être. L'utilisation d'un modèle animal est indispensable, car nous travaillons avec un aliment promoteur de la carcinogenèse (l'expérimentation chez l'Homme est donc impossible) et aucun modèle cellulaire ne permet de modéliser le lien aliment/cancer. Ce projet permettra de mieux comprendre l'effet de la consommation intermittente de viande rouge, de type consommation du "week-end".

9749 Le nombre de personnes atteintes d'hépatites, notamment les hépatites fulminantes, est de plus en plus associé à la prise de médicaments qu'elle soit intentionnelle ou accidentelle. L'hépatite fulminante est associée à une destruction des cellules du foie conduisant au décès quasi systématique du patient. Parmi les médicaments impliqués, le paracétamol (ou acetaminophen) représente, dans les pays développés, la cause majeure de décès liés à une hépatite fulminante. En France, les enfants de 1 à 4 ans sont les plus sujets aux intoxications accidentelles, alors que les 10 à 19 ans représentent une classe d'âge où les tentatives de suicide sont les plus conséquentes. Aux Etats-Unis ou en Grande Bretagne, le paracétamol représente un véritable enjeu de santé publique, notamment pour les sujets jeunes. En effet, aux Etats-Unis, le paracétamol est responsable d'environ 80 000 consultations aux urgences, 30 000 hospitalisations et 500 morts par an. La NAC (N-Acetylcysteine) est le seul antidote administré aux patients qui ont été intoxiqué par le paracétamol. Cependant, l'effet protecteur de la NAC est dépendant du temps écoulé entre le traitement et l'overdose au paracétamol. De plus, de fortes doses de NAC sont nécessaires puisqu'elle possède une faible absorption ce qui augmente le coût du traitement de manière importante. En outre, l'utilisation de concentrations importantes de NAC sur une période de temps longue est associée à de nombreux effets secondaires. Par conséquent, le développement d'un antidote plus efficace, avec une période de traitement courte et qui serait moins onéreux serait d'un grand intérêt pour une meilleure prise en charge des patients intoxiqués aux médicaments dont le paracétamol.

La protéine HGF/SF (Hepatocyte Growth Factor/Scatter factor) et son récepteur cellulaire, MET, jouent un rôle essentiel dans la régénération des tissus et plus particulièrement la régénération du foie. La protéine NK1 qui est un dérivé de l'HGF/SF est capable d'activer le récepteur MET. A l'inverse, une partie de l'HGF/SF, appelée domaine K1 ne présente qu'une très faible activité. Le développement de dérivés de l'HGF/SF peut avoir un grand intérêt en médecine régénérative, cependant, l'utilisation de l'HGF/SF ou de NK1 présente de nombreuses limitations. En effet, la synthèse de l'HGF/SF montre quelques difficultés. De plus, l'HGF/SF et NK1 sont sensibles à la dégradation et possèdent une faible diffusion aux tissus. Dans le but de produire de nouvelles molécules capables d'activer le récepteur MET et de s'affranchir des nombreuses limitations associées à l'utilisation de l'HGF/SF ou de NK1 en thérapeutique, un excellent dérivé de l'HGF/SF a été généré et active correctement le récepteur MET. En effet, il est capable de protéger les souris d'hépatites fulminantes induites par une drogue non médicamenteuse. Afin d'avoir une application plus réaliste, nous avons choisi d'évaluer l'efficacité de notre dimère sur un modèle d'hépatite fulminante induite par une intoxication à différents médicaments dont le paracétamol. Nous avons pu mettre en avant, en utilisant un modèle in vitro de cellules foie, que le dérivé de l'HGF/SF est capable d'empêcher la mort induite par le paracétamol et ce de manière plus conséquente que la NAC. Au vu des résultats intéressants obtenus dans les cellules, il nous semble important de les confirmer in vivo et de vérifier si le dérivé de l'HGF peut être une molécule intéressante pour une meilleure prise en charge des patients intoxiqués et qui présentent des hépatites médicamenteuses qu'elles soient ou non fulminantes. Pour ce faire, 200 souris seront nécessaires pour obtenir des résultats robustes qui viendront confirmer les différents résultats obtenus in vitro. Nous utiliserons un nombre plus restreint de souris puisque les mises au point ont été réalisées sur les cellules. Le modèle de souris permettra de venir confirmer l'action du dérivé de l'HGF/SF sur un organe entier en prenant en compte les propriétés d'absorption et d'élimination du paracétamol et aussi la diffusion et l'efficacité du dérivé de l'HGF/SF. Au cours des expérimentations, les souris seront suivies toutes les heures afin d'évaluer leur bien-être, ainsi, toute souris présentant des signes de détresse (difficulté respiratoire, prostration, baisse de la vivacité,.) sera mise à mort.

9750 L'objectif de ce projet est de déterminer chez l'animal les doses sans effet toxique de candidats médicaments à visé antitumorale. Dans le cadre de la recherche préclinique, ces doses permettront la réalisation d'études d'évaluation de l'efficacité antitumorale de molécules innovantes sans effets secondaires, en validant les schémas ainsi que les voies d'administration. ce projet constitue une brique du développement préclinique des traitements en cancérologie qui conduiront à la mise sur le marché de nouveaux traitements anticancéreux innovants permettant une meilleure prise en charge des patients souffrant de cancer.

Ce projet est prévu pour tester une gamme de doses prédéfinies lors d'études préliminaires in vitro afin de mettre en évidence la diversité d'effets secondaires induits par l'administration d'un traitement.

Ce projet est réalisé sur souris porteuses de tumeur (ou PDX pour Patient Derived tumor Xenografts) afin de mettre en évidence les interactions possibles entre la croissance tumorale et les effets d'un traitement. Ces modèles, développés au cours des dernières années, sont les seuls actuellement permettant de reconstituer sur animal la complexité des tumeurs humaines.

Ce projet, d'une durée de 2 ans, vise à évaluer 40 traitements innovants selon la même procédure expérimentale, soit au maximum 2520 animaux. Ce nombre d'animaux pourra être réduit en fonction des modèles tumoraux utilisés. Les changements opérés lors des différentes répétitions sont le modèle tumoral et le traitement (doses, schémas et voies d'administration).

Concernant la règle des 3Rs, ces études ne peuvent pas être réalisées in vitro. La mise en évidence des effets engendrés par l'administration d'un traitement ne peut se faire que sur des organismes entiers, tel que les rongeurs, pour étudier tous les paramètres observables depuis l'administration jusqu'à l'élimination des composés administrés. Par conséquent, à ce jour, l'utilisation de l'animal ne peut pas être Remplacée.

Les modèles utilisés sont parfaitement maîtrisés et permettent de n'utiliser que le nombre strictement nécessaire d'animaux et d'obtenir des résultats pertinents. Les traitements retenus pour ce projet auront été sélectionnés au préalable lors d'étude in vitro permettant la réduction du nombre de groupe à tester. Il sera, de plus, possible de regrouper plusieurs traitements sur un même modèle tumoral (1 seul groupe contrôle pour plusieurs traitements différents) et ainsi réduire le nombre total d'animaux qui recevront un traitement et par conséquent le nombre d'animaux inclus dans le projet. Toujours d'après les résultats in vitro, seuls les traitements démontrant les meilleurs effets anticancéreux seront testés in vivo permettant au mieux de raffiner ces études.

Les animaux seront acclimatés au moins 7 jours avant d'être greffés, puis seront greffés en sous-scapulaire sous anesthésie avec un mélange de kétamine et de tranquillisant. Outre la surveillance quotidienne post-greffe, les animaux seront surveillés au moins une fois par jour pendant le traitement afin de déceler et notifier rapidement tout signe de changement dans le comportement ou l'état de santé des animaux. En cas de modification du comportement normal ou de l'état de santé des animaux surveillés, des actions visant à prévenir douleur ou angoisse comme par exemple interruption du traitement, ajout de maison en carton, seront appliquées.

Enfin, ces analyses sont essentielles avant le passage aux études d'évaluation de l'efficacité antitumorale et permettent de Raffiner ces dernières sans effets secondaires qui masqueraient l'efficacité du traitement.

9751 Lors du développement de nouveaux médicaments et/ou sondes d'imagerie, il est nécessaire d'étudier la façon dont la molécule d'intérêt se distribue et est éliminée de l'organisme. Pour cela, si aucune donnée de littérature n'existe, nous vérifierons d'abord sur culture cellulaire que le composé étudié n'exerce pas de toxicité. Nous procéderons ensuite au marquage de la molécule (greffage de radioactivité ou de fluorescence qui va permettre sa détection par imagerie) puis au contrôle in vitro de la préservation de l'activité biologique de la molécule suite à ce marquage. Ce n'est qu'ensuite que nous administrerons la molécule marquée par voie intraveineuse à des souris afin de suivre celle-ci dans le temps par imagerie.

L'espèce de choix pour l'étude de la biodistribution de ces composés sera la souris saine ou porteuse de tumeur (en particulier dans le cas où le composé étudié est censé se localiser préférentiellement sur une cible tumorale).

Pour chaque étude (estimées à 10 études par an, 4 réalisées sur souris saines et 6 sur souris porteuses de tumeurs), nous formerons 4 groupes d'animaux (n=8 animaux par groupe, n=32 souris par étude) recevant le marqueur libre, ou la molécule d'intérêt à 3 doses distinctes. Sur 5 ans, nous estimons donc le nombre d'animaux à n=640 souris saines et n=960 souris porteuses de tumeurs soit 1600 au total.

La mise en place de ce projet s'est attachée à respecter la règle des 3R. Tout d'abord, en comparaison avec une étude de biodistribution classique qui nécessite la mise à mort des animaux à chaque point de temps examiné, l'imagerie nous permet de répéter l'imagerie à différents temps chez le même animal et donc de réduire le nombre d'animaux d'autant. L'étude préalable des molécules d'intérêt sur culture cellulaire permet de s'affranchir de l'utilisation d'animaux non justifiée et participe au raffinement de l'étude. Enfin, la totalité des procédures impliquant les animaux (injection intraveineuse et imagerie) est réalisée sous anesthésie suivie d'un réveil sous lampe chauffante pour réduire l'inconfort potentiel à son minimum. Il n'est pas possible de remplacer l'utilisation d'animaux pour ce projet visant à étudier le trajet dans l'organisme d'une molécule administrée par voie veineuse.

9752 Les animaux réagissent de façon individuelle et directe aux changements dans leur environnement par des ajustements comportementaux. L'étude de ces ajustements permet de comprendre des patrons écologiques généraux comme l'utilisation de l'habitat ou la distribution des espèces à une échelle globale. Les espèces ectothermes sont particulièrement sensibles aux variations de l'environnement car la régulation de leur température corporelle dépend de la distribution spatiale et temporelle des opportunités de thermorégulation comportementale. Cependant, bien qu'étant une ressource capitale, l'impact de l'eau sur leur biologie a été particulièrement sous-étudié par le passé. Notre équipe a déjà pu montrer que la régulation de l'état de déshydratation joue un rôle clé dans les compromis physiologiques et d'effort de reproduction des individus chez le lézard vivipare (*Zootoca vivipara*), une espèce ectotherme caractéristique des zones humides et froides en conditions naturelles. Sachant que se chauffer induit une augmentation de la vitesse de déshydratation chez cet organisme, nous cherchons à tester si une diminution de la disponibilité en eau dans l'environnement change les comportements de thermorégulation. A cet effet, nous allons simuler une restriction hydrique pendant une semaine chez 72 lézards (36 mâles et 36 femelles) réparti en trois répétitions temporelles indépendantes. La moitié des individus vivra dans de grands terrariums arrosés trois fois par jour pour mimer les conditions les plus humides que cette espèce connaît dans la nature, l'autre moitié vivra dans de grands terrariums seulement arrosés le matin pour mimer les conditions les plus sèches que cette espèce rencontre dans la nature. Nous observerons régulièrement le comportement des animaux et leur température corporelle. Au début et à la fin de l'expérience, les animaux seront pesés et subiront une prise de sang pour évaluer leur état de déshydratation. Nous nous attendons à observer une activité réduite dans les cas de stress hydrique afin que les individus limitent leur déshydratation. Un échantillon minimum sera utilisé en étudiant uniquement une seule classe d'âge (adulte), les conditions d'élevage impliqueront un enrichissement des cages et des conditions climatiques estivales habituelles du milieu naturel, et il est impossible de remplacer le modèle biologique de cette étude par un équivalent cellulaire ou in silico.

9753 Le glutamate est le neurotransmetteur excitateur majeur du système nerveux central. Avant sa libération, il est accumulé dans des vésicules synaptiques par trois transporteurs appelés VGLUT. Les VGLUTs sont des acteurs clés de la transmission excitatrice et donc de toutes les fonctions cérébrales. Le ciblage et la manipulation fonctionnelle de ces transporteurs constitue un enjeu majeur tant d'un point de vue fondamental qu'appliqué. En effet, il n'existe pour le moment que très peu de composés permettant de moduler leur fonction, de ce fait, les conséquences de cette modulation fonctionnelle sur la physiologie restent méconnues. En collaboration avec des chimistes, nous avons développé plusieurs milliers de composés, et sélectionné le plus efficace afin de tester ses propriétés in vivo. La modulation de ces transporteurs pourrait permettre de réduire la surexcitation des réseaux neuronaux comme observée lors de crises épileptiques par exemple. C'est pourquoi nous

souhaitons tester l'effet de ce composé sur des crises épileptiques induites chez le rongeur. Pour cela, deux paradigmes d'induction de crises seront utilisés et comparés : l'un basé sur l'agoniste cholinergique pilocarpine et l'autre sur l'antagoniste GABAergique pentylentetrazole. Nous comparerons chez les différents groupes d'animaux injectés dans la procédure n°1 le délai d'apparition des crises ainsi que les manifestations comportementales de celles-ci (classifiées selon l'échelle de Racine). Notre hypothèse est que le prétraitement avec l'inhibiteur sélectionné réduirait considérablement l'occurrence des crises épileptiques et/ou leur sévérité et par conséquent, pourrait constituer une nouvelle approche au traitement de ces crises fortement handicapantes pour l'individu.

Au total, 200 souris adultes seront utilisées dans ce projet.

La règle des 3R a été considérée tout au long de l'élaboration de ce projet et sera appliquée au quotidien. Pour la réduction, des expériences précédentes nous ont permis de définir le nombre minimal d'animaux permettant de générer des données statistiquement solides. Concernant le raffinement, pour toute cette étude, les animaux seront hébergés avec un cycle jour/nuit adapté et avec la boisson et la nourriture ad libitum. Ils feront l'objet d'un contrôle quotidien par une personne compétente. Ces contrôles doivent permettre de repérer tout animal malade ou blessé et de prendre les mesures appropriées. Ces contrôles seront enregistrés. Des méthodes seront mises en place pour réduire ou supprimer la douleur, la souffrance et l'angoisse des animaux (injection d'antalgiques ou bien mise à mort par injection d'une surdose d'anesthésique). Concernant le remplacement, les approches in vitro ne permettent pas l'étude de comportements souhaités.

9754 Trouver des molécules efficaces et peu toxiques dans la stratégie anti-tumorale est toujours une priorité de la recherche fondamentale et appliquée. Le but de ce projet est de tester des nouvelles molécules, impliquées dans le métabolisme, pour la prophylaxie du cancer du sein. Au sein de notre laboratoire, nous avons sélectionné in vitro des molécules inédites qui ont un effet anti-tumoral. Afin de valider le potentiel anti-cancérogène de ces molécules, nous allons les évaluer in vivo. Cette question ne peut être abordée qu'in vivo car ces molécules sont impliquées dans le métabolisme dont la complexité ne peut pas se reproduire dans des systèmes in vitro. Nous souhaiterons effectuer cette étude en utilisant des souris immunocompétentes (n. 1380) et immunodéficientes (n. 360). Ce projet se dessine sur 5 ans et implique des expériences d'évaluation du métabolisme et de croissance tumorale. Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des expérimentations a été mis au point afin de respecter les exigences de remplacement, réduction et raffinement pour permettre une interprétation fiable des résultats dans le respect du bien-être animal. Les expérimentations seront regroupées au maximum afin de réduire le nombre d'animaux contrôles. L'étude sera arrêtée si la procédure initiale invalide l'hypothèse de travail. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et adaptées en accord avec le personnel de l'animalerie (les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum; le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification et/ou tunnels en cartons). Les animaux sont observés quotidiennement afin de respecter leur bien-être. La mise en place d'une grille de suivi strict des points limites permettra d'éviter au maximum le stress et/ou la douleur au cours de l'expérimentation. De plus, le personnel impliqué dans ce projet est qualifié sur le plan technique et formé en continu sur les pratiques d'expérimentation animale. Il assure également une veille scientifique continue, évitant toute expérimentation déjà rapportée dans la littérature. Plusieurs tissus seront prélevés et soumis à diverses analyses (immunologiques, histologiques ou de biologie cellulaire et moléculaire) pour extraire le maximum de données de chaque expérimentation. Ces tissus seront également partagés avec nos collaborateurs dans le but de réduire le nombre d'animaux utilisés.

9755 Le stress oxydatif est connu pour jouer un rôle majeur dans le développement de nombreuses maladies neurodégénératives. L'eau hydrogénée contient de l'hydrogène moléculaire dissous, qui est le plus puissant antioxydant connu à ce jour. L'hydrogène moléculaire est l'un des principaux composants des gaz intestinaux contenant des molécules produites et utilisées par une grande variété de bactéries du système digestif. L'hydrogène moléculaire a récemment été reconnu comme un nouveau membre de la famille des gaz médicaux car il apparaît neutraliser les radicaux toxiques libérés lors du stress oxydatif. Il réduit l'expression de facteurs pro-inflammatoires et préserve la

réactivité cérébrovasculaire, caractéristiques des pathologies neurodégénératives. Des études récentes ont permis de confirmer les effets bénéfiques de l'hydrogène moléculaire dans un grand nombre de maladies chroniques telles que divers types de démence ou la maladie de Parkinson. Ces effets ont été obtenus avec des doses très basses d'hydrogène moléculaire, cependant, l'administration de ces doses implique de boire chaque jour de l'eau enrichie en hydrogène moléculaire selon un protocole strict, car l'hydrogène moléculaire est rapidement éliminé de l'eau. Ce mode d'administration est une limite majeure de l'efficacité des traitements à l'hydrogène moléculaire. C'est pourquoi dans ce projet, nous souhaitons développer de nouveaux modes de production et de libération d'hydrogène moléculaire directement dans l'organisme afin d'éviter les contraintes de l'eau de boisson. Nous planifions de les tester dans deux modèles rongeurs de maladie neurodégénératives : un modèle de rat parkinsonien et un modèle de souris Alzheimer. Nous chercherons à vérifier si ces nouveaux modes de production de l'hydrogène moléculaire permettent de diminuer les marqueurs pathologiques de nos modèles. Ce projet est composé de 7 procédures expérimentales et requerra l'utilisation d'un maximum de 1770 rongeurs sur 5 ans.

Remplacement : Ce projet a pour but de mesurer des marqueurs pathologiques au cours de l'évolution des maladies neurodégénératives testées. De ce fait, il est impossible de remplacer notre préparation in vivo par un modèle cellulaire ou une simulation computationnelle.

Réduction : Ce nombre d'animaux a été déterminé de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en gardant suffisamment pour ne pas compromettre la validité des expériences qui seront menées.

Raffinement : Le projet implique la mise en place d'un état pathologique chez le rongeur avec de la chirurgie lésionnelle de classe modérée. Cependant, l'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et évalué grâce à une grille codifiant le niveau de douleur. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance.

9756 Chez l'homme, la possibilité de contrôler les deux mains de façon indépendante est cruciale pour les activités de la vie quotidienne et implique une latéralisation du contrôle moteur. Le cortex moteur primaire transmet la commande motrice appropriée à la main controlatérale au travers d'un faisceau cortico-spinal croisé. Les mouvements en miroir (MM) sont des mouvements involontaires survenant d'un côté du corps, accompagnant de façon symétrique et simultanée les mouvements volontaires controlatéraux. Les sujets atteints de MM congénitaux sont incapables d'effectuer un mouvement manuel unilatéral strict. Toute activité bi-manuelle élaborée nécessitant une dissociation des mouvements des deux mains est impossible. Il n'y a à ce jour pas de traitement efficace. Les bases moléculaires qui permettent la mise en place d'un contrôle moteur latéralisé au cours du développement sont mal connues.

Notre projet propose de disséquer ces bases moléculaires en nous appuyant sur des modèles de souris transgéniques déficientes pour des gènes impliqués dans le guidage des axones corticospinaux afin i) de caractériser un phénotype « MM » chez la souris par des tests comportementaux, ii) de clarifier les mécanismes développementaux qui aboutissent à l'existence d'un contingent anormal de fibres corticospinales ipsilatérales. Nous effectuerons également des électroporations des gènes mutés chez des souris embryonnaires pour étudier l'effet de ces protéines mutés sur le développement du faisceau corticospinal. La technique d'électroporation permet de ne pas générer de nouvelles lignées de souris et donc de diminuer le nombre de souris. Plusieurs types de tests seront effectués. Une première série de tests comportementaux sera effectués sur chaque lignée de souris (15 souris transgéniques et 15 souris contrôles) par lignée. Cela nous permettra d'évaluer si la lignée présente ou non des déficits moteurs spécifiques. Puis, nous effectuerons une seconde série de tests plus spécifiques. Certains animaux seront soumis à une chirurgie pour visualiser le faisceau corticospinal et révéler la présence éventuelle d'un contingent de fibres non croisées. Sur certaines de ces souris, nous réaliserons également des tests pour mesurer l'électromyogramme au niveau des pattes après stimulation dans le cortex moteur. Ainsi le nombre d'animaux soumis à une chirurgie sera restreint.

Le nombre total de souris utilisées dans ce projet sera de 710.

La règle des 3R a été considérée tout au long de l'élaboration de ce projet et sera appliquée au quotidien. Pour la réduction, des expériences précédentes nous ont permis de définir le nombre minimal d'animaux permettant de générer des données statistiquement solides. Concernant le raffinement, pour toute cette étude, les animaux seront hébergés avec un cycle jour/nuit adapté et avec la boisson et la nourriture ad libitum. Ils feront l'objet d'un contrôle quotidien par une personne compétente. Ces contrôles doivent permettre de repérer tout animal malade ou blessé et de prendre les mesures appropriées. Ces contrôles seront enregistrés. Des méthodes seront mises en place pour réduire ou supprimer la douleur, la souffrance et l'angoisse des animaux (injection d'antalgiques ou bien mise à mort par injection d'une surdose d'anesthésique). Concernant le remplacement, les études in vitro et sur les invertébrés ne permettent pas l'étude de comportements tel que le contrôle moteur latéralisé. Les rongeurs, en revanche, utilisent leurs pattes avant pour effectuer des mouvements complexes et sont donc des modèles particulièrement bien adaptés. Ce travail permettra de déterminer certaines bases moléculaires du contrôle moteur latéralisé et de définir le rôle du faisceau cortico-spinal dans ce processus.

9757 Le système dopaminergique joue un rôle majeur dans les processus menant à l'addiction aux drogues, et notamment à la nicotine. La nicotine est la principale substance addictive du tabac. Elle agit sur ce système via les récepteurs cholinergiques de type nicotiques, qu'elle détourne de leurs fonctions physiologiques. Exposé à un stress, l'individu développe des stratégies pour s'y soustraire. L'adaptation moléculaire et cellulaire du système dopaminergique sous-tendant ces processus de défense peut induire différents troubles comportementaux favorisant l'établissement d'une dépendance à la nicotine.

Cette étude vise à déterminer :

- Comment un stress social altère l'activité électrophysiologique du système dopaminergique en réponse à une exposition à la nicotine.
- Quel est le rôle de la modulation cholinergique dans les altérations du système dopaminergique induit par un stress social répété.

Ainsi, cette étude de recherche fondamentale, participera à établir de quelle manière le stress et l'addiction au tabac sont étroitement liés.

Cette étude sera menée sur 784 souris mâles adultes. Cette estimation comprend : des souris C57/Blc6 sauvage et transgéniques porteuses de mutations des sous-unités des récepteurs cholinergiques de type nicotinique (ACNA7, ACNA7B2, ACNB2 : 470) ; ainsi que des souris mâles anciens reproducteurs (CD1 : 314).

Le plan d'expérimentation proposé, qui s'étend sur 5 ans, consiste à effectuer sur les mêmes animaux, les tests comportementaux ainsi que les enregistrements électrophysiologiques, et de les mener en parallèle chez les individus tests et contrôles de manière à diminuer la variabilité induite par des facteurs externes ou intrinsèques. La diminution de cette variabilité nous permettra de diminuer le nombre d'animaux utilisés. Il y aura un suivi quotidien des animaux pour assurer le meilleur raffinement possible.

L'étude vise à décrire comment l'activité du réseau neuronal est altérée par le stress et la nicotine lors de comportements d'approches sociales. Aussi il nous est indispensable d'étudier ce phénomène chez l'animal in vivo afin de conserver l'activation des sous-réseaux neuronaux intact. Les analyses et études statistiques seront effectuées quotidiennement, permettant ainsi de ne pas utiliser inutilement des animaux et donc d'en réduire le nombre.

Le choix de ce modèle animal se justifie, entre autre, par la présence d'un réseau méso-cortico- limbique et cholinergique très similaire à celui de l'homme, ce qui n'est pas le cas chez les invertébrés, les poissons ou les oiseaux.

Enfin, la génétique de la souris offre des outils de modulation du réseau neuronal, ce qui est difficilement accessible chez d'autres animaux. L'ensemble de ces propositions vise à respecter la règle des 3R.

9758 L'obésité représente le cinquième facteur de risque de décès au niveau mondial et fait au minimum 2,8 millions de victimes chaque année. En France, 6,5 millions de personnes (environ 15% de la population adulte) sont considérées comme obèses. 60 à 90% des patients atteints de diabète non

insulino-dépendant (diabète de type 2[DT2]) sont obèses. La stéatose hépatique 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 tissu adipeux augmente avec l'obésité et corrèle avec le développement de l'inflammation (locale et chronique), qui est reconnue comme un événement crucial dans le développement du diabète de type 2. 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 et la pseudo kinase MLKL, est impliquée dans la progression de l'obésité vers le syndrome métabolique incluant le diabète de type 2 et la stéatose hépatique non alcoolique, et qu'une nouvelle stratégie thérapeutique dans ces maladies consisterait à bloquer la nécroptose.

Le projet vise à identifier la contribution de la nécroptose au développement de l'obésité et de ses complications telles que le DT2 et la NAFLD. Pour ce faire, nous ferons une recherche sur des modèles d'obésité chez des souris génétiquement modifiées pour inhiber ou activer les voies de la nécroptose dans différents types cellulaires (adipocytes, hépatocytes).

La perspective est de développer de nouveaux traitements pour prévenir la mort des cellules du tissu adipeux et par conséquent réduire le développement des complications liées à l'obésité telles que le DT2 et la NAFLD.

Type d'animaux : Souris transgéniques invalidées ou exprimant les gènes d'intérêts dans différents contextes.

Nombre d'animaux : Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 792 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 continue. De plus, une démarche en constante de raffinement sera mise en œuvre grâce à l'amélioration permanente des conditions d'hébergement (enrichissement, soins, etc.) et des procédures décrites dans ce projet.

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, 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.

9759 Au cours de l'évolution de l'Homme, certains changements morphologiques et fonctionnels ont eu lieu simultanément. En particulier, *Homo neanderthalensis* diffère d'*Homo sapiens* à la fois par la forme de son crâne, la morphologie de son cerveau et, vraisemblablement, ses facultés comportementales. Ces traits pourraient avoir évolué indépendamment, mais pourraient aussi avoir une origine génétique commune, liée à la mutation de gènes pléiotropes régulant simultanément ces différents caractères. Parmi ces gènes qui ont été proposés pour ces rôles, *Dlx5* et *Dlx6* sont de candidats de choix à la lumière de leurs multiples fonctions morphogénétiques. L'implication de *Dlx5/6* dans la morphogenèse cranio-faciale a été clairement montrée, mais les connaissances sur les rôles de *Dlx5* et *Dlx6* dans les comportements sont pour le moment parcellaires. Il est cependant

décrit que des anomalies de ces gènes sont à l'origine de défauts cognitifs semblables à certains endophénotypes de pathologies, telles la schizophrénie ou l'autisme.

Pour étudier le rôle des gènes Dlx5 et Dlx6, des souris permettant l'inactivation conditionnelle simultanée des deux gènes ont été engendrées. L'objectif du projet est donc d'étudier en détail les changements comportementaux de ces animaux.

Puisque les gènes Dlx5/6 sont exprimés dans les neurones gabaergiques, nous étudierons donc des animaux (Dlx5/6VgatCre) invalidés dans ce type neuronal. Nous étudierons les comportements de type anxieux et de type dépressif, les comportements sociaux et les comportements connus pour impliquer les noyaux accumbens et caudate putamen, comprenant de nombreux neurones gabaergiques.

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 d'un maximum de 904.

9760 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.

La protéine chaperonne HSP110, surexprimée dans plusieurs cancers dont le cancer colique au niveau du cytoplasme. Les données cliniques montrent que l'expression nucléaire d'HSP110 est associée à un mauvais pronostic chez le patient atteint de cancer colique de type MSI.

L'objectif de ce projet est de démontrer que la surexpression de la forme nucléaire d'HSP110, induit une augmentation de la croissance tumorale ainsi qu'une résistance aux agents-anticancéreux (5-Fluorouracil et Oxaliplatine), prescrits en routine pour le traitement des cancers du colon

Le projet consiste à xénogreffer des cellules cancéreuses (lignées de cancer colique) qui surexpriment de manière stable la forme nucléaire et/ou la forme cytoplasmique d'HSP110. A la suite de la prise de greffe les souris seront traitées au 5-Fluorouracil et Oxaliplatine qui a déjà été validé. La progression tumorale sera évaluée à l'aide des mesures de la taille de la tumeur avec un pied à coulisse.

Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 120 souris NMRI-Nude Foxn1(Nu/Nu) 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 ». 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 tumoral. Il n'est pas possible de recréer in vitro la complexité d'un organisme entier avec tous les acteurs cellulaires rentrant en jeu.

Réduction : Nous limitons au maximum le nombre d'animaux par groupe de façon à obtenir des résultats statistiquement fiables. A cause des variabilités inter-animales et intergroupes, un nombre trop restreint d'animaux engendrerait des résultats trop variables et non valides. Compte tenu des données de la littérature (variabilité attendue) et des effets espérés, un test de puissance statistique a été utilisé pour déterminer le nombre minimum d'animaux nécessaire pour cette étude.

Raffinement : Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des procédures ont été mise au point afin de permettre une interprétation fiable dans le respect du bien-être animal, en limitant la douleur et le stress (anesthésie, analgésie, etc.). Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation, les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum. Le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification ou de maison de type igloo. Nous nous efforçons à chaque instant de raffiner nos procédures afin de garantir le bien-être des animaux en cours de procédure grâce à une surveillance attentive (point limite) et des soins adaptés.

9761 Au cours du développement préclinique, un grand nombre d'études sont effectuées afin de qualifier le candidat médicament sur le plan de la pharmacologie, de la pharmacocinétique et de la toxicologie. Ces études sont constitutives d'une partie du dossier de demande d'autorisation de mise sur le marché (AMM) du futur médicament ; elles répondent à des normes internationales de qualité scientifique et sont étroitement évaluées par les autorités de santé au moment de délivrer l'AMM. Parmi ces études, les études de pharmacocinétique permettent de décrire le comportement et le devenir du composé dans un organisme vivant. Classiquement il s'agit de modéliser son absorption, sa distribution dans l'organisme, son métabolisme c'est à dire comment l'organisme procède à sa transformation et enfin à son élimination. Ainsi, les études de pharmacocinétique ont pour but de fournir les connaissances nécessaires à l'adaptation de la posologie pour obtenir les concentrations plasmatiques d'un médicament entraînant l'effet optimum, c'est-à-dire la meilleure efficacité avec le minimum d'effets indésirables. La pharmacocinétique repose sur l'étude de la variation de la concentration plasmatique du médicament, seul paramètre facilement accessible. La concentration plasmatique d'un médicament dépend des conditions de son administration, unique ou répétée, de la voie utilisée et du nombre de compartiments dans lesquels il se distribue. Ces études doivent être réalisées chez une espèce rongeur et non rongeurs avec l'utilisation de plusieurs voies d'administration (orale, topique, intraveineuse, intramusculaire.) et à plusieurs concentrations. Pour une étude classique de pharmacocinétique chez le cochon visant à étudier 3 doses d'un composé candidat administré par deux voies différentes, 3 animaux sont utilisés et car ils peuvent être réutilisés à chaque session expérimentale. Dans ce cas, une période de 'washout' d'une et deux semaine entre chaque étude pharmacocinétique est nécessaire pour que l'animal puisse récupérer physiologiquement selon le volume de sang qui a été prélevé lors de la session de pharmacocinétique. Cette procédure permet alors de n'utiliser que 3 animaux qui seront réutilisés pour réaliser plusieurs études pharmacocinétiques. Dans le cas d'administration topique, de petits fragments de peau réalisés par punch peuvent être réalisés, sous anesthésie, en fin de protocole pour évaluer la concentration directe du composé dans le derme à un temps donné après son application. Au cours de chacune des sessions de prélèvements, plusieurs prélèvements de sang sont réalisés sur une période de 24 à 48h heures en général, dans la limite des 15% de la volémie totale estimée. Pendant les études, les animaux sont suivis individuellement et régulièrement afin de détecter tout signe clinique anormal et tout signe de douleur et/ou détresse selon une grille d'évaluation de comportement appropriée. Elle inclut notamment des éléments relatifs au comportement des animaux envers leurs congénères, leur comportement lors des interactions avec l'homme, leur posture, leur activité, leur comportement alimentaire et les changements physiologiques observables. Des points limites sont alors 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 conditions d'hébergements sont conformes à la législation en vigueur pour éviter tout stress des animaux. Les animaux seront hébergés en groupe (hors étude pharmacocinétique pour éviter les contamination) du fait de leur caractère sociable et bénéficieront d'un programme d'enrichissement.

Sur 5 ans, le nombre d'études pharmacocinétiques est estimé à 2 par an donc le nombre maximal estimé d'animaux inclus dans ce projet est de 30 cochons (si les animaux peuvent être réutilisés) pour un total de 10 séries expérimentales sur 5 ans, soit une moyenne estimée à 10 composés candidats testés sur 5 ans. Cette estimation du nombre d'animaux utilisés est basée sur le nombre moyen d'études de ce type réalisées par an depuis les 5 dernières années.

9762 Projet : Les nævi congénitaux (NC) sont des tumeurs bénignes de taille variable présentes dès la naissance et d'origine mélanocytaire. Les mélanocytes qui constituent ces tumeurs bénignes infiltrent l'épiderme et le derme. Certains NC (NC de grande taille ou NCG) peuvent atteindre plus de 20 cm à l'âge adulte. Ces lésions de grande taille ont un retentissement socio-esthétique majeur chez l'enfant. De plus, elles sont à risque de dégénérescence en mélanome, tumeur maligne très agressive. Ce risque de transformation maligne augmente avec la taille de la lésion. L'excision chirurgicale est à l'heure actuelle le seul outil thérapeutique disponible.

Il a été montré qu'un type de mutation génétique était capable d'induire un NC de grande taille. De plus, des cellules mélanocytaires à caractère « souche » ont été mises en évidence au sein de ces tumeurs bénignes. Par ailleurs, certaines voies de signalisation affectant la survie et la prolifération cellulaire sont sur activées dans les naevocytes de NCG.

L'objectif de ce travail est de tester in vivo (xénogreffes de tissus humains naeviques sur souris immunodéprimées) différents inhibiteurs des voies de signalisation identifiées dans le but de développer un traitement médical intra-lésionnel innovant dans ces tumeurs de l'enfant.

Type d'animaux : Souris immunodéficiente de type Rag2-/-

Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 300 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.

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.

9763 La nicotine, principale substance addictive du tabac, agit sur le cerveau en se liant à des récepteurs appelés récepteurs nicotiques (ou nAChR). L'effet primaire de la nicotine sur le système nerveux central est de se lier sur les récepteurs nicotiques et de les activer, ce qui va conduire à une modification de l'activité électrique des neurones. Il existe de nombreux types de récepteurs nicotiques neuronaux, qui sont distribués dans tout le cerveau et ont des fonctions biologiques variées. La nicotine va donc avoir des effets physiologiques différents en fonction des zones du cerveau sur lesquelles elle agit, mais aussi en fonction des récepteurs nicotiques qu'elle active. Identifier et comprendre le rôle spécifique de chaque type de récepteur et de chaque région du cerveau lors des différentes phases de l'addiction (mise en place, consommation, manque, rechute...) est donc crucial à la compréhension des mécanismes de la dépendance à la nicotine et au développement de nouvelles thérapies.

A cette fin, nous développons des techniques innovantes qui permettent de contrôler les récepteurs nicotiques du cerveau en utilisant la lumière comme stimulus à la place de la nicotine. L'idée est de greffer un nano-interrupteur chimique (ou photoswitch) sur le récepteur nicotinique. Cette technologie permet d'utiliser la lumière pour photo-contrôler spécifiquement et précisément ce récepteur modifié dans une région ciblée du cerveau.

Le but de ce projet est d'utiliser des récepteurs nicotiques photo-contrôlables (aussi appelés LinAChR, pour light-controlled nAChR) chez la souris in vivo, afin de 1) comprendre comment l'acétylcholine endogène module les circuits neuronaux de l'addiction à la nicotine ; 2) comprendre

comment la nicotine détourne le fonctionnement normal de ces circuits 3) induire ou inverser, avec la lumière, des symptômes associés à l'addiction à la nicotine, tels que le renforcement ou le manque.

Pour cela nous utiliserons des souris C57B/6 de type sauvage (WT) et des souris invalidées pour certaines sous-unités des nAChRs (b2^{-/-} et b4^{-/-}). Nous utiliserons également des lignées GAD67-Cre et DAT-Cre afin de restreindre l'expression des LinAChR aux neurones GABAergiques et dopaminergiques des voies neuronales de l'addiction. Nous utiliserons des LinAChRs b2 et b4, avec 3 photoswitchs différents : un agoniste (MACCh), un antagoniste (MAHoCh) et un antagoniste avec un spectre d'absorption décalé vers le rouge, pour un meilleur photo-contrôle in vivo (red MAHoCh). Pour l'ensemble des conditions, nous estimons que nous utiliserons 660 animaux pour ce projet qui s'étend sur 5 ans. Le choix des animaux se justifie par la présence d'un circuit de l'addiction (notamment un réseau dopaminergique et cholinergique) très similaire à celui de l'Homme, ce qui n'est pas le cas chez les invertébrés, les poissons ou les oiseaux. Enfin, la génétique de la souris offre des outils de modulation du réseau neuronal, ce qui est difficilement accessible chez d'autres animaux. De manière à restreindre le nombre d'animaux, les analyses et études statistiques seront effectuées quotidiennement, permettant de ne pas utiliser inutilement des animaux. Toutes les procédures chirurgicales seront effectuées sous anesthésie et un analgésique sera administré afin de minimiser la souffrance au réveil. L'ensemble de ces propositions vise à respecter le principe des 3Rs. Notre projet se focalisera sur les récepteurs nicotiques; néanmoins, les technologies développées ici seront adaptables à d'autres récepteurs, circuits neuronaux ou modèles animaux.

9764 La protéine Gcm2 a un rôle essentiel dans la mise en place du système immunitaire chez la mouche drosophile. Sa présence est précoce et transitoire au cours du développement des cellules immunitaires de la mouche. Cette protéine est décrite pour limiter la réponse inflammatoire.

Chez la souris, elle est également décrite de manière précoce et transitoire au cours du développement des cellules productrices d'anti corps.

Dans une tumeur humaine, la réponse inflammatoire est plus complexe que chez la mouche car elle fait intervenir beaucoup plus d'acteurs. La souris est un bon modèle pour étudier ces phénomènes d'inflammation, car tout d'abord elle est plus proche de l'Homme et elle permet l'utilisation de modèles transgéniques.

Ainsi, pour déterminer si la protéine Gcm2 a un intérêt dans la réponse inflammatoire tumorale, nous souhaitons mettre en place une étude pilote permettant d'évaluer les variations des cellules immunitaires présentes dans les tumeurs de souris C57bl6, C57bl6 déficientes pour Gcm2 (C56bl6 mGcm2^{-/-}).

Pour cela, des souris C57bl6, C57bl6 TgCT (contrôle des souris transgéniques déficientes pour Gcm2) et C56bl6 mGcm2^{-/-} femelles recevront une injection sous cutanée de cellules tumorales de la lignée mammaire 4T1. La croissance tumorale sera suivie tous les 2 jours par mesure de la tumeur sur 2 dimensions. Les souris seront mises à mort lorsque la taille des tumeurs aura atteint 20 mm sur sa plus grande dimension. Les tumeurs, rates, ganglions drainant et non drainant la tumeur seront prélevés pour analyser par cytométrie de flux la quantité respective de chaque population de cellules immunitaires ainsi que leur niveau d'activation. Parallèlement, des études d'expression par RT-qPCR seront réalisées.

La même expérience sera réalisée ensuite sur un autre modèle tumoral de cancer pulmonaire LLC1. Ainsi pour la totalité de l'étude, nous aurons besoin de 10 C57bl6, 10 C57bl6 TgCT et 10 C56bl6 mGcm2^{-/-}, soit un total de 30 souris.

La mise en place de ce projet s'attachera à respecter la règle des 3R. Comme ce travail est une étude pilote, nous nous avons réduit au maximum le nombre d'animaux et n'utiliserons que 5 souris par groupe. Des études préliminaires ont été réalisées sur des cultures de cellules in vitro par un de nos collaborateurs remplaçant ainsi l'utilisation d'animaux. Enfin, les procédures présentant un inconfort potentiel seront réalisées sous anesthésie permettant ainsi le raffinement.

9765 Les cancers du sein et du côlon font partie des quatre cancers les plus fréquents avec le cancer de la prostate et du poumon. Actuellement les traitements du cancer du sein et du côlon reposent sur

l'utilisation du 5-Fluorouracile administré en association avec d'autres chimiothérapies. 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. Il a récemment été montré que la modulation du système immunitaire pouvait être utilisée pour traiter le cancer. Ceci est illustré par les rémissions impressionnantes de patients atteints de cancer de la peau avancés ou de cancers pulmonaires traités avec des nouvelles thérapies impliquées dans l'activation des globules blancs. Cependant plus de 60% des patients ne répondent pas à ces nouveaux traitements, ce qui nécessite la compréhension des événements moléculaires impliqués dans cette résistance des cancers à l'action du système immunitaire. L'objectif de ce projet est donc d'étudier la réponse immunitaire dans trois modèles murins de cancers, deux modèles de cancers du côlon et un modèle de cancer du sein, puis de traiter ces animaux avec divers agents immunomodulateurs pour tester leur efficacité anticancéreuse. Pour cela nous travaillerons avec les modèles tumoraux CT26, lignée cellulaire d'adénocarcinome colique murin dérivée de souris Balb/c, 4T1, lignée cellulaire d'adénocarcinome mammaire dérivée de souris Balb/c et MC38, lignée cellulaire d'adénocarcinome colique murin dérivée de souris C57BL/6. Nous réaliserons un suivi de la croissance tumorale des animaux qui auront été traités ou non avec divers agents immunomodulateurs. Comme il a été suggéré que certains agents immunomodulateurs pouvaient renforcer l'efficacité des chimiothérapies classiques, l'efficacité anticancéreuse de ces agents immunomodulateurs sera ensuite testée en association avec la double chimiothérapie 5-Fluorouracile + Oxaliplatine couramment utilisée pour le traitement du cancer chez l'homme. La mise en œuvre de ce projet permettra donc de rendre compte de l'efficacité de traitements immunomodulateurs novateurs dans ces modèles; de mettre en lien leur effet anticancéreux avec l'état d'activation et/ou d'épuisement des cellules immunitaires et enfin de tester si leur activité est bénéfique ou non lors d'une association avec la chimiothérapie. Le nombre total de souris prévues pour la mise en œuvre de ce projet est de 708.

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 ce qui permet donc de réduire le nombre d'animaux de l'étude. La mise en œuvre du projet prévoit également de réaliser des tests fonctionnels avec les composés testés sur des cellules immunitaires *in vitro* ce qui 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.

9766 Les patchs de couleur chez les animaux forment une catégorie majeure de signaux de communication qui reflètent des traits de qualité individuels corrélés avec des facteurs génétiques et/ou avec la condition phénotypique. Pour être efficaces, les signaux doivent être fiables de manière à permettre au signaleur et au receveur d'en tirer des bénéfices nets en terme de survie ou de succès reproducteur. D'après la théorie évolutive, la fiabilité d'un signal de couleur peut être maintenue si un coût significatif est associé à la production et/ou maintenance du signal, expliqué par la base endocrinienne de production du signal qui garantirait son honnêteté face à la duperie. Les signaux de couleur peuvent être de nature pigmentaire, structurelle, ou le fruit d'une association entre ces deux modes de production. La recherche sur les signaux de couleur s'est traditionnellement focalisée sur les couleurs pigmentaires et les couleurs structurelles (telles l'ultraviolet UV) étaient traditionnellement considérées comme relativement invariantes, peu coûteuses à exprimer et par conséquent peu informatives. Cependant, un nombre grandissant d'études a montré que les couleurs UV sont très variables entre individus de la même espèce et peuvent potentiellement dépendre de la condition phénotypique. L'objectif de ce projet est d'étudier les coûts potentiels liés à l'expression des signaux UV sur la gorge de lézards afin d'améliorer notre compréhension de l'évolution des signaux de couleur chez les animaux. Dans cette optique, nous échantillonnerons 14 populations naturelles du lézard vivipare (*Zootoca vivipara*) afin de capturer 15 subadultes et 15 adultes mâles dans chaque population (soit 420 individus) afin de comparer avec des méthodes non-invasives la coloration UV, la morphologie et la charge en parasites externes des individus avant et après maturation sexuelle. Chez les mâles adultes, des prises de sang et des prélèvements de tissus permettront de corrélérer le signal UV à l'intensité de la sécrétion

de testostérone, du stress oxydatif et la charge en endoparasites ainsi que de mesurer la contribution de la variabilité moléculaire génomique à l'expression du signal. Il s'agit d'une étude sur l'animal capturé en milieu naturel sans possibilité de remplacement par des modèles in vitro ou mathématiques. Afin de réduire et raffiner nos protocoles, nous capturerons un nombre faible de mâles dans chaque population (moins de 10% de la population totale estimée) en général sur une seule journée de capture, les animaux seront relâchés dans leurs populations d'origine et les procédures expérimentales seront choisies pour être faiblement invasifs.

9767 La demande pour des analgésiques/antalgiques d'efficacité supérieur à celle des opiacés mais dénués d'effets secondaires n'est pas satisfaite. L'industrie pharmaceutique continue donc à investir activement dans la recherche de nouvelles classes d'analgésiques/antalgiques. Dans ces recherches, les molécules candidates aux essais cliniques sont sélectionnées quasi exclusivement sur la base de résultats comportementaux. Les échecs récurrents de l'industrie pharmaceutique dans la tentative de mise sur le marché de nouveaux antalgiques mettent en évidence la nécessité d'élaborer des stratégies de développements complémentaires (pour ne pas dire alternatives), à celles basées sur une évaluation exclusivement comportementale de l'efficacité des candidats médicaments.

Une méthode complémentaire aux tests comportementaux consiste à mesurer directement l'activité électrique des neurones impliqués dans le codage de la douleur. Parmi ces derniers, les neurones dits « de projection » de la moelle épinière sont une cible de choix. Ces neurones de la moelle épinière reçoivent des informations directes et indirectes des fibres nerveuses périphériques à l'origine des sensations douloureuses. Ils projettent à leur tour vers les centres du cerveau impliqués dans la génération des sensations douloureuses. La réponse de ces neurones (c.à.d. le nombre et la fréquence de potentiel d'action qu'ils génèrent) est proportionnelle à l'intensité nociceptive des stimuli appliqués, et elle est réduite (pour un stimulus d'intensité donné) par les traitements analgésiques/antalgiques.

L'utilisation d'animaux pour les tests d'efficacité d'analgésiques/antalgiques est rendue nécessaire par le fait que, dans de nombreux cas, le mécanisme d'action de ces médicaments est un processus complexe impliquant la totalité du système nerveux (de manière imagée, des communications entre le cerveau, la moelle épinière, et les tissus périphériques). La mesure de l'activité des neurones spinaux se fait chez l'animal anesthésié et permet donc de pouvoir tester l'efficacité du candidat médicament sur la réponse à des stimuli très nociceptifs, ce qui n'est pas envisageable chez un animal vigile. Ces tests apportent donc des informations indispensables au développement de nouveaux médicaments, informations qui ne peuvent être obtenue par d'autres moyens, tout en garantissant une absence de souffrance chez l'animal qui est anesthésié. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, plusieurs doses de candidats médicaments peuvent être testées chez un même animal. Le nombre d'animaux utilisés est aussi réduit par le fait que chaque animal est son propre contrôle (principe des mesures répétées). Utilisé de manière précoce dans le développement de candidats médicaments et la détermination de leur cible, ces expériences permettent de réduire l'utilisation d'animaux dans des tests comportementaux qui ont tendance à générer des faux positifs. Il est essentiel que ces expériences soient réalisées au sein d'un laboratoire très spécialisé pour garantir que chaque animal utilisé génère des données de qualités. Le but de ce projet est d'établir et d'utiliser des protocoles robustes d'enregistrement de ces neurones spinaux pour permettre le criblage de candidats médicament chez le rat et la souris anesthésiés dans le cadre d'une société de service pour l'industrie pharmaceutique. Il existe de nombreuses sociétés de service qui utilisent des animaux pour des tests comportementaux, mais il n'existe pas encore de société spécialisée dans le domaine de l'électrophysiologie in vivo pour la douleur dans le monde. Ce projet concerne l'utilisation de 1100 rongeurs (rats ou souris) sur 5 ans.

9768 Les virus géants associés aux amibes constituent une thématique de recherche en plein essor depuis la découverte d'*Acanthamoeba polyphaga* Mimivirus, le premier d'entre eux en 2003. En 2009, Marseillevirus devient le membre fondateur d'une nouvelle famille de virus géants associés aux amibes qui va se développer avec la découverte de 8 autres membres entre 2009 et 2017. En 2013, un membre de la famille des Marseilleviridae est mis en évidence dans le sang de donneurs

de sang. On découvre également que les sujets ayant reçu de nombreuses transfusions sanguines sont plus nombreux à porter des anticorps dirigés contre Marseillevirus que les sujets non transfusés. Ces données posent inévitablement la question de la transmission Marseillevirus par voie sanguine et donc de la sécurité des produits sanguins. Des recherches plus systématiques sur échantillons de patients ont pu prouver la présence du passage de Marseillevirus dans le sang et les ganglions, en particulier chez un bébé atteint d'une inflammation ganglionnaire ou adénite. La présence de ce virus a aussi été démontrée dans un ganglion lymphomateux chez une femme atteinte d'une maladie de Hodgkin. D'autre part, la possibilité d'un portage prolongé au niveau des amygdales chez l'Homme a été mise en évidence chez un jeune homme ayant présenté des troubles neuro-vestibulaires.

La question de la pathogénicité de Marseillevirus chez l'Homme et de façon plus générale chez les mammifères, reste posée : sa présence dans un tissu inflammatoire est-elle fortuite ou est-elle la cause d'une réponse inflammatoire?

Par ailleurs, par analogie avec d'autres virus comme l'Epstein Barr Virus, la présence de Marseillevirus dans le sang, les amygdales, et dans des ganglions lymphatiques, et plus particulièrement dans un ganglion lymphomateux pose la question d'un lien éventuel entre l'infection par Marseillevirus et le développement de lymphomes. Les deux mécanismes principaux impliquant des agents infectieux dans des lymphomes correspondent à une stimulation antigénique chronique et la transformation clonale directe. Nous nous proposons d'étudier le rôle potentiel de Marseillevirus dans le lymphome en mettant au point un modèle murin d'infection expérimentale par Marseillevirus, en exposant régulièrement et sur le long terme les animaux à ce virus, ce qui correspondrait à une stimulation antigénique chronique. L'étude de l'éventuelle pathogénicité de Marseillevirus chez l'Homme, du tropisme pour certains organes lymphoïdes et son éventuelle implication dans des lymphomes ne peut être étudiée in vitro ni chez l'homme. La seule façon d'évaluer son rôle ne peut être faite qu'in vivo dans des conditions physiopathologiques. Les modèles animaux dont le système lymphatique a une physiologie proche de l'Homme sont les mammifères et parmi eux, la souris est la plus appropriée par sa facilité de manipulation. Le projet consiste à inoculer par voie orale une suspension de Marseillevirus à des souris. L'inoculation par voie orale se fera sans douleur pour les animaux puisqu'elle sera réalisée en mettant le virus dans les biberons d'eau de la cage. Cette manière d'infecter les souris permettra de ne créer ni angoisse ni douleur chez les animaux. Le nombre d'animaux sera réduit grâce à la diminution du nombre d'animaux nécessaires à 4 pour chaque période d'évaluation, la réduction du nombre d'animaux contrôles, la réduction à 18 du nombre de périodes d'évaluation. Aucune procédure supplémentaire ne sera mise en œuvre dans l'intervalle qui sépare l'inoculation de l'euthanasie. Tous les animaux seront euthanasiés en fin d'expérimentation correspondant à 18 temps déterminés d'évaluation. Après euthanasie, des prélèvements d'organes seront effectués en post-mortem immédiat et une éventuelle prolifération cancéreuse sera recherchée après conditionnement des tissus ou liquides biologiques en particulier au sein des organes lymphoïdes. L'ensemble de ces expérimentations sera réalisé sur un groupe de souris sauvages, afin d'établir un éventuel lien entre l'infection par Marseillevirus et le développement de lymphomes.

Ce projet sera réalisé dans un laboratoire de sécurité microbiologique de classe 3 (NSB3). Les souris seront hébergées en cage de plexiglas de 5 animaux placés dans l'isolateur prévu à cet effet ou dans le portoir ventilé avec des cages à filtre HEPA. Ce projet mettra en œuvre des méthodes très peu invasives (infection des souris par le biais de l'eau de boisson) afin de réduire l'angoisse des animaux. Le nombre maximal d'animaux utilisé dans cette étude sera de 110.

Le critère d'évaluation principal sera la recherche d'un lymphome.

9769 Peu de données scientifiques relient la structure des protéines à la façon dont elles sont dégradées au cours de la digestion et à leur devenir après assimilation. Certaines protéines ont la même composition en acides aminés (AA) mais ne présentent pas les mêmes structures car les procédés d'extraction utilisés pour les obtenir sont différents. C'est le cas notamment des caséines du lait dont les différences de structures sont susceptibles de modifier le devenir digestif et métabolique de leurs AA. D'autre part, la biodisponibilité des AA est également susceptible de varier selon différents facteurs physiologiques, comme l'âge et le niveau d'adiposité (quantité de masse grasse).

Caractériser l'effet de la structure des protéines ainsi que l'impact de l'âge et du degré d'adiposité sur la biodisponibilité des AA de protéines alimentaires chez l'animal permettrait d'optimiser les caractéristiques nutritionnelles et fonctionnelles des protéines en fonction de la population cible à laquelle elles sont destinées, par exemple les personnes âgées, et répondre ainsi plus spécifiquement à leurs besoins.

Les objectifs de ce projet sont donc : d'évaluer l'effet de l'âge et l'adiposité sur la biodisponibilité des AA de caséines natives (c'est-à-dire des caséines dont la structure n'est pas modifiée par rapport à ce que l'on trouve dans le lait ; étude 1) et d'évaluer l'effet structure de la caséine sur la biodisponibilité des AA (étude 2) chez le rat.

Ainsi, dans une première étude, les effets de l'âge (jeune vs âgé) et de l'adiposité (élevée vs normale) sur la biodisponibilité digestive et métabolique des AA de caséines micellaires natives seront déterminés chez des rats Wistar mâles répartis en 4 groupes (n=8 rats/groupe). Des rats de 5 semaines (16 rats jeunes) ou âgés de 10 mois (16 rats âgés) seront inclus dans cette étude. Afin d'obtenir une adiposité élevée, les rats des groupes « adiposité élevée » (jeunes ou âgés) seront nourris durant 4 semaines avec un régime hypercalorique. Ensuite, les animaux recevront un repas-test contenant la caséine native marquée au ^{15}N , un isotope stable et non radioactif de l'azote qui permet de tracer le devenir digestif et métabolique des AA dans l'organisme. Des prises de sang à la queue seront réalisées et les urines collectées dans les heures suivant l'ingestion du repas et les animaux seront ensuite euthanasiés 6h après le repas pour collecter les contenus intestinaux des différents segments du tube digestif. Afin de déterminer le taux de synthèse protéique dans différents organes et tissus, les animaux recevront 0,5ml d'un traceur spécifique par injection sous-cutanée 30min avant l'euthanasie. L'analyse de l'enrichissement isotopique dans les AA des différents échantillons prélevés (sang, urine, tissus et contenus intestinaux) permettra de déterminer la biodisponibilité des AA de caséine native dans les différents groupes. Le groupe présentant la perte de biodisponibilité moyenne des AA la plus importante par rapport au groupe témoin (jeune, adiposité normale) sera choisi comme modèle pour une 2ème étude testant l'effet de la structure de la caséine. Dans cette 2ème étude, 4 types de caséines marquées au ^{15}N présentant des compositions identiques en AA mais des structures différentes liées aux procédés technologiques appliqués pour les obtenir seront testés (n=8 rats/type) et le protocole appliqué sera identique à celui de la première étude. Au total, 64 animaux seront inclus dans ce projet.

A l'heure actuelle, il n'existe pas de méthode alternative validée in vitro pour déterminer la biodisponibilité digestive et métabolique des AA car les méthodes de digestion in vitro ne permettent pas en l'état actuel des connaissances d'obtenir des données représentatives de la digestibilité in vivo des AA alimentaires. Nous devons donc avoir recours aux modèles animaux pour cela et le rat est un bon modèle car son régime alimentaire et son système digestif présentent des similarités suffisamment importantes avec ceux de l'Homme pour qu'une extrapolation des résultats obtenus soit envisagée. A partir des données déjà publiées sur le sujet, nous avons pris pour chaque expérimentation le nombre minimum d'animaux requis (n=8/groupe) pour atteindre une puissance statistique suffisante. Le projet se déroulera en 2 temps (2 études) afin de réduire le nombre de rats utilisés en sélectionnant dans un premier temps le modèle physiologique (rat âgé ou jeune avec une adiposité normale ou élevée) le plus discriminant et ne pas tester l'effet du type de caséine sur l'ensemble des groupes. Il est nécessaire d'héberger les animaux en cages individuelles car nous devons suivre la prise alimentaire tout au long de ces 2 études. Pour réduire le stress pouvant être engendré par ce type d'hébergement, les cages individuelles seront en plexiglas transparent permettant aux animaux de se voir et d'optimiser ainsi les interactions pouvant avoir lieu et seront enrichies avec des tunnels. Mis à part les prélèvements sanguins à la queue, les protocoles expérimentaux utilisés dans ce projet ne sont pas susceptibles d'induire de douleur spécifique. Néanmoins, la manipulation quotidienne des animaux pour les mesures du poids et de la prise alimentaire permettra de suivre de manière rapprochée l'état de santé des animaux et de détecter des modifications de leur état physique ou de leur comportement. Les prélèvements sanguins se feront au niveau d'une veine latérale de la queue par un expérimentateur entraîné à la procédure. Les volumes prélevés seront modérés (3ml au total) et ne dépasseront pas 15% du volume de sang des rats. Les animaux seront maintenus par un second expérimentateur dans un tissu et les jours précédents, les animaux seront habitués à cette contention afin de réduire le stress généré. Si une

perte de poids de plus de 15% sans cause apparente et sans récupération ou des diarrhées sans cause apparente sont détectées grâce au suivi rapproché de chaque animal, il sera sorti du protocole expérimental et euthanasié si son état de santé ne s'améliore pas rapidement.

9770 Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) incluant la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH) sont des pathologies constituant un véritable enjeu de santé publique, puisqu'elles sont particulièrement handicapantes et les approches de prise en charge des symptômes sont d'une efficacité relative, ce qui les rend encore incurables. Elles se manifestent par des phases de poussées inflammatoires d'une durée plus ou moins longues entrecoupées par des phases de rémissions. La cause exacte de ces pathologies demeure inconnue. Ce sont des pathologies multifactorielles et complexes. Dans ce contexte, mieux comprendre les facteurs impliqués dans le déclenchement des MICI et tester de nouveaux traitements pour la prise en charge de ces maladies est indispensable.

De nombreuses études ont montré une activation excessive du système immunitaire muqueux engendrant une réponse inflammatoire de type chronique et l'apparition de lésions intestinales dans un contexte de MICI. Il a également été montré dans un autre contexte inflammatoire (arthrite) qu'une vaccination par ADN pouvait moduler la réponse inflammatoire et ainsi diminuer la sévérité de la pathologie. Ces données antérieures nous encouragent donc à évaluer l'effet d'un vaccin à ADN sur la sévérité de l'inflammation dans un contexte de MICI.

Notre étude consiste à évaluer le potentiel thérapeutique d'un vaccin à ADN sur deux modèles différents de colite chez la souris et d'identifier les mécanismes cellulaires impliqués dans la modulation de la réponse immunitaire intestinale. Les résultats de cette étude pourraient représenter les premiers éléments du développement d'une nouvelle thérapie pour les patients souffrants de MICI.

A ce jour, l'animal reste le meilleur modèle représentatif des MICI rencontrées chez l'homme du point de vue de la complexité de la physiologie de l'intestin et de l'implication de nombreux acteurs dans la réponse inflammatoire.

1. Remplacement : Il n'existe aucune approche *in vitro* qui pourrait nous permettre d'étudier des pathologies inflammatoires chroniques multifactorielles comme les MICI. Une étude chez un organisme vivant est indispensable pour mettre en évidence le potentiel effet thérapeutique d'un vaccin à ADN sur l'ensemble des paramètres (système immunitaire, microbiote intestinal, etc...) impliqués dans le développement des MICI.

2. Réduction : L'étude sera réalisée avec un nombre total de 102 souris afin de constituer les différents groupes d'analyses. Pour réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés, les groupes « contrôles » seront composés de 5 souris seulement alors que les groupes « tests » seront composés de 12 souris. Ces effectifs sont nécessaires et suffisants pour obtenir des résultats statistiquement significatifs, au vu des analyses qui seront conduites à partir de ces animaux.

3. Raffinement : Dès leur réception, les animaux auront une période d'acclimatation d'une semaine pour s'adapter à leur nouvel environnement. Ils seront hébergés dans une animalerie dotée de tous les paramètres nécessaires (température, hygrométrie, filtration de l'air, ...) à leur bien-être. Toutes les procédures expérimentales (traitement pro-inflammatoire, traitement thérapeutique, coloscopie, ...) auront lieu dans cette même animalerie qui représente un environnement sécurisant pour l'animal. La colite sera induite de deux façons par l'administration de deux types d'agent colitogène (TNBS et DSS). Ce protocole expérimental est couramment utilisé pour induire une MICI expérimentale représentative de celle observée chez l'homme. Le traitement thérapeutique sera réalisé par injection intramusculaire par un personnel technique qualifié. Ce vaccin à ADN que l'on souhaite utiliser a déjà montré ses effets bénéfiques dans le traitement d'autres pathologies inflammatoires comme l'arthrite. Par ailleurs, une procédure d'estimation (avec des paramètres définis) et suppression de la souffrance sera mise en place. Le point limite sera fixé à 20% de perte du poids corporel avec identification des signes de mal-être définis au préalable par notre vétérinaire référent. En fin de protocole, les animaux seront mis à mort et des prélèvements d'organes seront effectués pour permettre de réaliser les analyses biochimiques.

9771 Les parasitoses comme les filarioses affectent des millions de personnes dans les zones tropicales. Les filaires sont des nématodes parasites de l'homme et de nombreux vertébrés terrestres et sont toujours transmis par des arthropodes hématophages.

Le développement de résistance aux traitements actuels et l'absence de vaccin justifient la demande pour de nouvelles études en particulier sur des modèles animaux de références pour analyser le développement parasitaire, les réponses immunitaires, et les pathologies. Comme aucune filaire de l'homme ne se développe dans un modèle animal standard comme la souris, nous utilisons un modèle murin de filariose avec la filaire de rongeur *Litomosoides sigmodontis*, laquelle présente de nombreuses caractéristiques proches de celles des filaires de l'homme. Le développement en 5 stades du parasite se fait d'abord dans le vecteur qui est un acarien, puis dans un rongeur –souris ou gerbille de Mongolie. Les stades 1 ou microfilaires sont dans le sang du rongeur et sont prélevés par l'acarien pendant un de ses repas sanguins. Les stades 1 muent en stades 2 puis en stades 3 dans l'acarien. Les stades 3 ou stades infestants sont inoculés dans la peau et migrent de la peau vers la cavité pleurale ; là ils muent en stades 4 puis en adultes, mâles et femelles, qui se reproduisent et libèrent des milliers de stades 1. La phase d'inoculation dans la peau se fait en inoculant un nombre donné de stades 3 afin d'évaluer le rendement parasitaire à un temps donné et pour tester l'impact de réponses immunitaires particulières, de molécules macrofilaricides ou microfilaricides, de peptides vaccinaux. Le cycle doit donc permettre d'obtenir un nombre important de stades 3 mais aussi de stades 1 et d'adultes pour les études prévues dans les 5 ans à venir (- tests de drogues anti-filariennes pour 400 souris par an, tests de drogues anti-filariennes pour 200 mérions par an, tests de drogues anti-microfilarieuses in vitro avec 1000 microfilaires par puits dans des plaques de 96 puits, analyse de la réponse immunitaire chez des souris et pathophysiologie de l'infection, comparaison du développement filarien dans des souris BALB/c présentant des environnements immunitaires différents).

Ce projet présente les étapes nécessaires à l'entretien du cycle de *Litomosoides sigmodontis* chez la gerbille et l'acarien afin de produire des stades 3, des adultes et des stades 1.

Ces expériences ne peuvent pas être remplacées par des méthodes alternatives car les filaires ne muent pas in vitro. Afin de répondre à l'exigence de réduction du nombre d'animaux, ces expériences, réparties sur une durée de 5 ans, seront réalisées sur un nombre maximal de 930 gerbilles qui permettront 1/ d'entretenir le cycle, 2/ de réaliser les projets de recherches associés à ces stades.

Les animaux seront maintenus en cage dans le respect de la réglementation (taille des cages, enrichissement, nourriture, soins). En ce qui concerne la limitation des douleurs, souffrances et angoisses, un suivi quotidien attentif des animaux, une analyse comportementale et l'utilisation d'une grille de scores d'évaluation de la douleur sont effectués en routine à l'animalerie.

9772 Notre projet vise à étudier l'efficacité de nouveaux traitements anticancéreux dans les cancers du sein et de l'ovaire. Chez la femme, le cancer du sein est le plus fréquent et la première cause de mortalité par cancer. Le cancer du sein appelé triple-négatif est un sous-type de cancer qui représente environ 15 % des cancers du sein et est particulièrement agressif. A l'heure actuelle, il n'existe pas de thérapie ciblée pour ce sous-type de cancer. Le cancer de l'ovaire est la cinquième cause la plus fréquente de décès par cancer chez les femmes. Le cancer de l'ovaire de haut grade est un cancer peu fréquent mais dont le pronostic vital est très mauvais (5 à 15 % de survie à 5 ans). Identifier de nouvelles thérapies pour ces deux types de cancers est donc une nécessité et un besoin urgent.

Le cancer du sein triple-négatif et le cancer de l'ovaire de haut grade partagent plusieurs aspects génétiques, comme des mutations communes de certains gènes, qui font que des combinaisons thérapeutiques identiques pourraient être efficaces pour ces deux types de cancers.

Nous avons montré in vitro que l'association de deux molécules réduit significativement la prolifération de cellules humaines de cancer du sein réfractaires à tout traitement. L'une d'elles réduit les réserves de molécules nécessaires à la synthèse de l'ADN et ralentit la prolifération des cellules. Chaque cellule subit en permanence des agressions au niveau de son ADN. Afin de transmettre fidèlement ses gènes à ses cellules-filles, des mécanismes de surveillance contribuent à réparer la molécule d'ADN endommagée ou à tuer la cellule si les dommages ne sont pas

réparables. La cible de notre deuxième inhibiteur fait partie des acteurs indispensables à ces mécanismes.

Nous émettons l'hypothèse que l'association des deux molécules auxquelles nous nous intéressons pourrait être une nouvelle stratégie dans le traitement de certains cancers. En vue de futures applications cliniques qui exigent la démonstration d'efficacité de traitement sur au moins un modèle animal, ces études in vivo sont nécessaires et incontournables.

Notre expérimentation comparera des groupes de souris porteuses de tumeurs prélevées chez des patientes atteintes de cancers du sein et de l'ovaire. Ces groupes de souris recevront soit un traitement contrôle, soit un traitement avec une seule molécule, soit la combinaison des deux inhibiteurs, soit des chimiothérapies communément utilisées.

Le plan expérimental a été conçu en prenant en compte la règle des 3R :

- 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 : Les expériences sur les animaux ont été précédées de nombreuses expériences réalisées sur des lignées cellulaires. Ces mises au point in vitro nous permettent de diminuer le nombre d'animaux à utiliser dans les expériences in vivo. Nous limitons au maximum le nombre d'animaux par groupe de façon à obtenir des résultats statistiquement fiables. A cause des variabilités inter animales et intergroupes, un nombre trop restreint d'animaux engendrerait des résultats trop variables et non valides.

- Raffinement : Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des procédures ont été mis au point afin de permettre une interprétation fiable dans le respect du bien-être animal : les points limites ont été établis dans la procédure expérimentale, les animaux seront surveillés quotidiennement, l'hébergement sera modifié par enrichissement du milieu et le nombre d'animaux par cage sera limité.

Cette étude nécessite l'utilisation de 688 souris Nude sur une durée de cinq ans. Ces souris sont immunodéficientes ce qui permet de réaliser des xénogreffes de tumeurs humaines dans un modèle murin sans rejet par le système immunitaire. Elles constituent donc le meilleur modèle pour des études de croissance tumorale à partir de xénogreffes de tumeurs humaines.

9773 Il existe plus d'une cinquantaine de formes d'épilepsies. Pour chaque forme, certains antiépileptiques seront efficaces quand d'autres seront aggravants. Dans le cas d'un patient qui présente une première crise, une erreur de diagnostic sur la forme d'épilepsie en question peut donc entraîner une aggravation des crises par la prescription d'un antiépileptique inadapté et donc un état de pharmaco-résistance. Les épilepsies pharmaco-résistantes s'accompagnent souvent de troubles cognitifs. Mais on ne sait pas si ces troubles cognitifs sont dus à l'épilepsie elle-même ou au traitement initial inadapté. C'est le sujet de ce projet.

L'objectif de cette étude vise donc à montrer dans un modèle souris d'épilepsie absences, l'effet d'un traitement antiépileptique inadapté initial sur 1/ d'une part, l'effet d'un second traitement adapté et 2/ d'autre part, sur la présence de troubles cognitifs. L'effet du second traitement sera évalué en enregistrant l'activité électro-encéphalographique corticale tandis que la présence d'hypothétiques troubles cognitifs sera évaluée à partir de tests comportementaux.

Dans le strict respect de la règle des 3R, l'élaboration des procédures a objectivé la minimisation d'une hypothétique souffrance des animaux avec une détermination précise des points limites (Raffinement) :

- Maintien de la température corporelle durant l'opération chirurgicale (tapis chauffant) et après l'opération (lampe infra-rouge)

- Addition d'un analgésique (Rompum à 0.1%) en complément de l'anesthésiant pour prévenir toute douleur

- Application d'un gel oculaire pour prévenir du dessèchement de l'œil durant la chirurgie.

- Administration des antiépileptiques à température ambiante en respectant les bonnes pratiques de laboratoire.

Le nombre d'animaux (n=72) inclus dans le projet a été minimisé pour permettre une approche statistique pertinente pour l'évaluation de nos hypothèses (Réduction), et enfin il faut préciser qu'il

n'est pas envisageable d'utiliser une approche in vitro (Remplacement) en suppléance à l'approche in vivo.

9774 Les maladies chroniques inflammatoires de l'intestin (MICI) sont des pathologies constituant un véritable enjeu de santé publique, puisqu'elles sont particulièrement handicapantes, incurables actuellement, et les approches de prise en charge des symptômes sont d'une efficacité relative. Ces pathologies sont multifactorielles et complexes. Elles se manifestent par des poussées inflammatoires plus ou moins longues et fréquentes selon les patients. Dans ce contexte, comprendre les facteurs impliqués dans le déclenchement des MICI est indispensable pour établir de nouvelles prises en charges des patients, en particulier des approches préventives chez les patients à risque (prédisposés génétiquement en particulier).

Des études épidémiologiques indiquent qu'un apport calorique important et le surpoids semblent être associés avec un risque augmenté de MICI et des prises en charge plus compliquées des patients. De plus, des études expérimentales sur des souris transgéniques obèses ont confirmé une exacerbation de l'inflammation. A l'inverse, une diminution de l'apport calorique semble avoir un effet bénéfique sur des pathologies inflammatoires. Compte tenu de ces observations, la compréhension des mécanismes liant l'apport calorique et l'inflammation intestinale est importante. Notre étude consiste d'une part à comparer la sévérité de l'inflammation intestinale induite par un agent colitogène chez des souris préalablement soumises à différents régimes alimentaires avec des doses variables de sucres, d'autre part à identifier les mécanismes cellulaires et physiopathologiques responsables de la modulation de la sévérité de l'inflammation.

La physiologie de l'intestin est complexe et la réponse inflammatoire implique de nombreux acteurs présents dans l'ensemble de l'organisme d'où l'utilisation de modèle in vivo, sur des souris car il existe des modèles transgéniques permettant d'étudier les maladies métaboliques en lien avec le surpoids, ce qui permettra de faire des liens avec ces modèles, ou d'envisager des poursuites de notre travail avec ces modèles transgéniques.

1. Remplacement : il n'existe pas d'alternative d'approche in vitro car l'étude porte sur un régime alimentaire de 8 semaines dans des conditions de nutrition précises.

2. Réduction : l'étude portera sur des groupes mâles de souris de laboratoire âgées de 8 semaines au début du protocole, réparties en 4 groupes d'étude selon leur régime alimentaire dans des conditions croissantes de teneur en sucres. Chaque groupe sera subdivisé en deux sous-groupes : traités ou non traités avec l'agent colitogène (DSS) afin d'induire l'inflammation du colon. Ainsi, 40 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 (régime spécial, traitement pro-inflammatoire, coloscopie) auront lieu dans l'animalerie, dans un environnement sécurisant pour l'animal et les coloscopies se feront sous anesthésie générale. Une procédure d'estimation et suppression de la douleur est mise en place. Le point limite est fixé selon un score défini au préalable et qui tient compte des signes éventuels de mal-être (isolement, yeux fermés, dos voûté, poils hérissés, immobilité, perte de poids, 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.

9775 Les cancers du sein triple négatifs (TNBC) sont des tumeurs hétérogènes, fortement invasives et de mauvais pronostic. La majorité d'entre eux ne surexprime pas ou peu le récepteur HER2, ni les récepteurs hormonaux (œstrogène/progestérone) et de ce fait ne bénéficie d'aucune des thérapies ciblées actuellement disponibles telles que le trastuzumab / pertuzumab (anti-HER2 thérapie) ou les hormonothérapies. Au regard du manque de solutions thérapeutiques spécifiques et efficaces, ces cancers de mauvais pronostic (15 à 30% des cancers du sein) représentent un défi clinique et de nombreuses pistes sont actuellement explorées afin d'élargir les options thérapeutiques de ces cancers soit à travers la découverte de nouvelles cibles, soit à travers le développement de nouvelles stratégies ou de nouvelles molécules thérapeutiques.

Notre projet s'intègre dans le cadre d'approches d'immunothérapie ciblée des cancers à base d'anticorps. Notre équipe développe un format d'anticorps bispécifiques ciblant un antigène tumoral

et un récepteur activateur (CD16) exprimé par une partie des cellules du système immunitaire responsables de la réponse antitumorale. L'hypothèse de travail de cette stratégie est de favoriser le rapprochement spatial des cellules immunes effectrices au site de la tumeur pour stimuler une réponse immune antitumorale. Nous avons développé sur ce modèle, 2 anticorps bispécifiques ciblant, d'une part les cellules immunitaires et d'autre part, soit HER2, soit la mésothéline au niveau des cellules tumorales.

Nous avons déjà montré in vitro (culture cellulaire et mammosphères 3D) que ces 2 anticorps bispécifiques sont plus efficaces et plus puissants que le trastuzumab sur des modèles de lignées cellulaires de TNBC. L'objectif du projet est donc, suite à ces résultats in vitro, de tester l'activité anti-tumorale de ces 2 anticorps bispécifiques in vivo afin d'apporter une preuve de concept de leur intérêt thérapeutique dans les TNBC et d'élargir le champ thérapeutique du trastuzumab à des cancers lui étant originellement résistants via la combinaison [trastuzumab/anticorps bispécifique antiHer2].

Dans ce but, nous réaliserons un modèle de xénogreffes à partir de cellules tumorales de TNBC exprimant Her2 et/ou la mésothéline transplantées chez des souris immunodéprimées (NSG). Lors de cette phase de greffe et dans le souci de la règle des 3R, outre l'anesthésie durant la chirurgie, nous réaliserons une analgésie péri-opératoire afin d'éviter toute douleur. Après apparition des tumeurs, les souris seront réparties aléatoirement dans les différents groupes de traitements. Le volume tumoral sera alors mesuré au pied à coulisse pour évaluer la capacité de chacun des 2 anticorps bispécifique à inhiber la croissance tumorale de ce sous-type de cancer. Durant l'ensemble de ces procédures, afin de réduire le stress et d'améliorer le cadre de vie des animaux, nous optimiserons les conditions d'hébergement des animaux, par la présence d'enrichissement dans les cages (copeaux de bois compactés et/ou coton), et par le maintien des animaux en groupes de 4 à 6 afin d'éviter le stress de l'isolement. En tenant compte de la confirmation des résultats cette demande fera appel au total à 312 souris NSG.

Le projet s'inscrit donc dans la recherche de nouvelles formes thérapeutiques. En effet, le développement de stratégies ciblées en cancérologie est devenu une option incontournable pour faire avancer la recherche médicale et améliorer les traitements des patients. L'objectif de ce projet est de développer une thérapie plus efficace pour les patientes. Le résultat attendu serait donc la validation in vivo de l'efficacité de 2 molécules seules ou en combinaison avec le trastuzumab dans le traitement du TNBC.

9776 Notre projet de recherche a pour thématique les complications cardiovasculaires du sujet diabétique. Nous étudions en particulier le rôle des plaquettes sanguines dans la thrombose, qui est la formation d'un caillot dans une artère provoquant l'arrêt du flux sanguin. En effet, l'activité des plaquettes des patients diabétiques est modifiée et augmente le risque de thrombose. Notre équipe a mis en évidence une augmentation de la stéfine A dans les cellules formant des plaquettes chez des souris obèses et diabétiques. La stéfine A, libérée par les plaquettes, pourrait donc jouer un rôle dans la thrombose.

L'objectif de notre travail est d'étudier l'effet de la modulation de la stéfine A dans la thrombose artérielle.

Nous avons déjà étudié l'effet de la stéfine A dans un modèle cellulaire in vitro (adhésion des plaquettes à une matrice synthétique en conditions de flux) mais cette technique ne fait pas intervenir toutes les cellules et les molécules présentes dans le sang. Nous utilisons la souris comme modèle d'étude, car plusieurs modèles de thrombose sont bien décrits et parfaitement maîtrisés par les expérimentateurs. De plus, nous utilisons une technique originale pour augmenter les taux circulants de stéfine A, qui est validée uniquement chez la souris : l'injection hydrodynamique. Nous utiliserons un modèle de thrombose artérielle sur le muscle crémaster avec blessure au laser et nous suivrons la formation du caillot dans les vaisseaux par vidéo-microscopie chez la souris anesthésiée durant toute la procédure.

Nous allons d'abord évaluer l'effet de l'augmentation circulante de la stéfine A sauvage ou mutée pour la rendre inactive; nous aurons donc un groupe ayant reçu la stéfine A sauvage, un groupe ayant reçu la stéfine A mutée et un groupe contrôle. Puis, nous évaluerons l'effet d'un inhibiteur

synthétique de l'enzyme sur laquelle agit la Stefine A, soit un groupe traité avec l'inhibiteur et un groupe non traité.

Le projet sera conduit en accord avec la règle des 3R :

Raffiner : Afin de limiter l'angoisse, l'inconfort, le stress et la douleur associés, les expériences sont raffinées. Les animaux seront surveillés tout au long de la procédure afin d'évaluer les signes de souffrance et de détresse et ainsi respecter les points limites que nous avons fixés (selon Morton et Griffiths).

Réduire : Nous utiliserons le nombre d'animaux strictement nécessaire pour obtenir des résultats statistiques fiables soit 4 souris par groupe. Le nombre d'animaux nécessaires tient aussi compte de l'expérience des expérimentateurs qui leur a permis d'évaluer la mortalité et d'efficacité de la technique. Un total de 20 souris sera donc utilisé dans ce projet.

Remplacer : Nous avons déjà effectué les études dans un modèle cellulaire in vitro. Etant donné la complexité du système étudié, nous entreprenons maintenant des études chez l'animal.

9777 La faune sauvage est de plus en plus exposée à des facteurs de stress anthropique. La répétition d'évènements stressants peut générer des effets néfastes sur la santé, en particulier en altérant l'immunité suite à l'augmentation de la concentration de l'une des hormones du stress (le cortisol). Mais la réponse de stress diffère selon les profils individuels (la personnalité), avec une augmentation du cortisol probablement plus forte chez les individus les plus réactifs par rapport aux proactifs. Les individus réactifs sont timides, peu agressif, néophobes (évitement de nouveaux stimuli), explorent peu leur environnement mais de façon minutieuse et présentent une flexibilité de leur répertoire comportemental. Sur le plan physiologique ces individus présentent une forte réponse hormonale avec une forte sécrétion de cortisol. A l'inverse, les individus proactifs sont téméraires, agressifs, explorent beaucoup leur environnement et présentent une faible réponse hormonale et donc une faible sécrétion de cortisol par rapport à des individus réactifs. Ce projet vise à montrer que le stress a un effet sur l'immunité qui est différent selon les profils de personnalité chez le chevreuil, une espèce d'ongulé sauvage abondante qui cohabite avec les activités humaines et pourrait être impliquée dans la circulation de nombreux agents pathogènes. Les résultats permettront de mieux comprendre les relations stress-personnalité-immunité chez le chevreuil, en précisant notamment les profils individuels les plus sensibles aux maladies dans un environnement stressant. Seule une approche expérimentale sur des animaux vivants permet d'obtenir des informations sur le comportement et la physiologie des individus, tout en enregistrant le stress subi par les animaux ainsi qu'en réalisant des mesures précises de la réponse immunitaire. Cette expérimentation de sévérité légère implique 17 chevrettes en élevage qui subiront un stress lié à un évènement de capture (injection de tranquillisant, prise de sang et collecte de fèces dans l'ampoule rectale) ainsi qu'une vaccination, puis une deuxième capture à l'issue des 4 semaines suivant la première capture. Avant, pendant, et après ces évènements, les femelles poursuivront leur vie habituelle dans leur enclos de prairie au contact de leurs soigneurs. Ces animaux sont tous adultes (croissance terminée et système immunitaire mature). Les procédures de capture, de manipulation, et d'observation (collecte de fèces au sol) sont peu invasives et conçues pour maintenir au maximum le bien-être des animaux (méthode de capture éprouvée conçue pour éviter l'affolement des animaux, tranquillisation chimique, entraînement comportemental, renforcement positif, personnel expérimenté et compétent). Une analyse de statistique de puissance préalable a permis de s'assurer que l'effectif est suffisant pour la taille d'effet attendu. Concrètement, la réponse physiologique de stress sera mesurée par la cinétique de la concentration en glucocorticoïdes dans les fèces. Les paramètres immunitaires innés et adaptatifs seront mesurés sur les prélèvements sanguins issus des 1ères et 2èmes captures. Les profils de personnalité individuels seront caractérisés sur 3 axes comportementaux : la néophobie (données déjà acquises), l'activité (pose de collier avec accéléromètres) et la réaction comportementale au stress (notation du comportement à la capture). L'intérêt scientifique du projet a été confirmé par un comité d'expert (comité de thèse) et l'ensemble du protocole a été approuvé par la structure bien-être animal de l'installation expérimentale.

9778 Avec plus de 25000 nouveaux cas par an en France, et environ 720000 dans le monde, le cancer du sein est le cancer le plus répandu chez la femme (première cause de mortalité entre 35 et 55 ans), sachant qu'une femme sur 9 développera une tumeur du sein au cours de son existence. La sévérité du tableau épidémiologique justifie donc les efforts à faire en matière de prévention, de dépistage précoce et de recherche thérapeutique.

Les Ténascines sont des molécules de la matrice extracellulaire impliquées dans de nombreux cancers, dont la surexpression est associée à un faible facteur pronostique. Nous étudions dans notre laboratoire à l'aide de plusieurs modèles *in vitro* et *in vivo*, une molécule spécifique appartenant à la famille des Ténascines : la Ténacine C (TNC).

La présente étude s'attachera à analyser l'impact de la TNC sur l'apparition et le développement des tumeurs de la glande mammaire, l'objectif étant de déterminer si cette molécule peut être une cible thérapeutique potentielle.

L'utilisation de lignées cellulaires en culture *in vitro* permet de proposer certaines hypothèses mais celles-ci doivent être validées dans un modèle *in vivo*, donc chez l'animal. De plus, les lignées cellulaires ne reflètent pas l'hétérogénéité (polyclonalité) présente dans les tumeurs. L'hétérogénéité tumorale est en effet l'un des mécanismes expliquant l'évolution et l'adaptation des cancers (la tumeur est composée de cellules dont le patrimoine génétique est différent, comme une mosaïque complexe formée de plusieurs clones).

Nous avons donc besoin d'un modèle animal pour mener des études les plus complètes possibles : environnement tumoral, réaction du système immunitaire, dissémination des métastases, mécanismes physiologiques impliqués, impact sur la survie, etc. Nous avons choisi le modèle murin car celui-ci est développé depuis de nombreuses années et possède de multiples avantages : nombreuses lignées génétiquement modifiées disponibles, facilité d'accès (utilisation et élevage pratiques, à moindre coût), modèle génétiquement proche de l'homme (plus de 90% d'homologie), etc.

Les modèles animaux génétiquement modifiés utilisés dans cette étude (développant spontanément des tumeurs mammaires), permettront d'une part d'analyser la progression tumorale observée chez l'homme dans le cancer du sein, et d'autre part d'étudier l'impact de la présence ou non de TNC sur le développement de telles tumeurs.

Réduire : Le nombre d'animaux nécessaire a été déterminé au minimum mais néanmoins suffisamment pour pouvoir réaliser une analyse statistique pertinente. L'algorithme de Lamorte est utilisé pour déterminer la taille de l'échantillon (outil de calcul de la taille des échantillons biologiques, Université de Boston). De ce fait 80 souris seront utilisées au total pour l'ensemble de cette étude.

Raffiner : Le protocole expérimental prend en compte un potentiel impact sur la souffrance animale et différents critères ont été établis pour justifier un arrêt de l'expérience en cours. Des points limites ont notamment été établis pour éviter toute souffrance animale. Les souris sont maintenues en groupe de 3 minimum par cage pour maintenir une interaction entre individus. L'environnement d'élevage est enrichi à l'aide de carrés de cellulose pour la construction des nids et de tunnels en plastique rouge pour favoriser l'activité des souris. Les souris ont accès *ad libitum* à une nourriture de type normal et à de l'eau filtrée. De plus, les souris seront surveillées quotidiennement jusqu'à la fin de l'expérimentation, pour détecter des signes éventuels de douleurs. Si une souris présentait des symptômes traduisant l'apparition de douleurs, une injection en IP d'un analgésique sera effectuée une fois par jour (Metacam 2mg/ml solution injectable, à raison d'une injection en IP de 0.2mg/kg de souris) jusqu'à disparition des symptômes. Les souris seront également pesées et leur état général évalué 3 fois par semaine. Les données issues de ce suivi individuel seront enregistrées dans un tableau spécifique définissant les points limites expérimentaux et aussitôt analysées. Par conséquent, si un animal atteint à un moment donné de l'expérience, un de ces points limites définis, il sera immédiatement mis à mort.

Remplacer : Le modèle animal est nécessaire car il n'existe pas de modèle pour reproduire *in vitro* l'ensemble des mécanismes impliqués dans cette étude.

9779 Le développement d'agrégats bactériens entourés d'une gangue protectrice, appelés biofilms, représente le mode de vie privilégié des bactéries dans la nature par opposition aux formes

individuelles, dites planctoniques. Les biofilms offrent aux bactéries une diminution de la susceptibilité aux agents antimicrobiens, mais également une résistance accrue aux attaques du système immunitaire de l'hôte et échappent en partie aux processus de phagocytose. De plus, il est admis que les bactéries sous forme de biofilm, dites sessiles, peuvent détourner la réponse immunitaire de l'hôte pour favoriser leur persistance.

Le développement des biofilms est un processus complexe qui se décline en plusieurs étapes, allant de l'adhésion initiale des bactéries au support, à la maturation des agrégats formés et à la libération de microorganismes à partir de ces structures. Ce dernier phénomène, appelé dispersion, permet la libération dans l'environnement immédiat de microorganismes. Ainsi, en médecine humaine, la plupart des bactériémies nosocomiales et des infections urinaires sont dues à une colonisation préalable des cathéters ou des sondes utilisées chez les patients par des bactéries sous forme de biofilms. Les propriétés des bactéries sessiles et de celles issues de la dispersion sont mal connues, notamment leurs capacités de colonisation et de virulence.

L'espèce bactérienne *Klebsiella pneumoniae* est placée au premier plan des pathogènes opportunistes responsables d'infections nosocomiales, en partie grâce à sa capacité à former des biofilms. *K. pneumoniae* est un organisme modèle particulièrement pertinent puisque cette bactérie est naturellement retrouvée à l'état commensal dans le tube digestif et les cavités naturelles de l'homme, mais également retrouvée associée à du matériel médical ou lors d'infections comme des bactériémies et des pneumonies.

L'objectif expérimental de ce projet est d'évaluer le pouvoir pathogène *in vivo* (colonisation des tissus, persistance *in vivo*, modulation du système immunitaire) de la bactérie *K. pneumoniae* inoculée sous forme sessile ou sous forme dispersée, comparativement à la forme planctonique. Les expériences seront réalisées sur des souris femelles C57BL/6 (âgées de 6 semaines) infectées par instillation intranasale ou voie intraveineuse. La charge bactérienne dans différents organes, la dissémination systémique des bactéries et la modulation de la réponse immunitaire seront les principaux paramètres évalués. Les expérimentations auront une durée maximale de 21 jours, et les animaux seront euthanasiés à l'issue de ces expérimentations.

Le recours à l'animal est indispensable pour ce projet : en effet, il n'existe pas de méthode alternative permettant d'évaluer simultanément les capacités de colonisation des tissus, de virulence et de persistance dans un même organisme hôte. De plus, les propriétés des bactéries sessiles et dispersées étant transitoires, elles doivent être inoculées « rapidement » et ne peuvent en aucun cas être supplémentées dans l'alimentation ou l'eau de boisson comme cela se pratique avec des modèles de drosophiles ou de vers.

Les expérimentations et la méthodologie seront optimisées afin de réduire l'inconfort, la douleur ou l'anxiété subies par les animaux. Des antalgiques seront administrés aux animaux si nécessaire. Les expérimentations seront organisées de façon à obtenir des résultats statistiquement exploitables avec le plus petit nombre d'animaux possible, et chaque expérience sera exploitée au maximum. Le nombre maximal estimé d'animaux est de 360 souris sur une période de 5 ans.

9780 Le projet proposé ici s'inscrit dans un programme de recherche dont l'objectif est de comprendre les mécanismes neurophysiologiques qui permettent de capturer du regard un objet visuel stationnaire ou en mouvement. En amenant l'image de l'objet sur la région de la rétine qui nous dote de la plus grande acuité visuelle (la fovéa), l'orientation du regard entraîne une analyse visuelle plus fine de l'objet ou le déclenchement de sa poursuite s'il est en mouvement. La réaction d'orientation permet aussi de localiser les objets, les uns par rapport aux autres et par rapport au corps. Elle commence par un mouvement extrêmement rapide (la saccade) des deux yeux, qui est parfois accompagné d'un mouvement conjoint de la tête. Un mouvement plus lent (réflexe ou volontaire) prend ensuite le relais et stabilise l'image de l'objet sur la rétine.

Le projet sera conduit chez le singe macaque rhésus car cet animal possède des systèmes visuel et moteur oculaires très similaires de ceux de l'Homme sur les plans morphologique (fovéa, vision binoculaire) et fonctionnel (champ oculomoteur étendu, capacités de découplage oculocéphalique et de poursuite oculaire lisse). Le recours à une expérimentation chez l'animal est inévitable car l'objectif de ces recherches est une compréhension neurophysiologique, c'est-à-dire de caractériser comment les interactions entre assemblées neuronales permettent à un organisme animal de

s'orienter dans son environnement externe. Les mouvements d'orientation oculaire et céphaliques produits en réponse à l'apparition de cibles visuelles sont enregistrés par une technique qui est basée sur le principe d'induction électromagnétique. Deux procédures expérimentales sont alors mises en œuvre. La première consiste à provoquer expérimentalement des dysfonctionnements localisés au niveau de territoires neuronaux bien spécifiques afin de comprendre leur place dans la neurophysiologie des fonctions d'exploration du milieu extérieur et ainsi déterminer spatialement (où précisément dans le cerveau) et temporellement (à quel moment) la symptomatologie qui affecte certains patients cérébrolésés. Ces dysfonctionnements sont réalisés de deux manières : soit par injection locale d'un agent pharmacologiquement actif, soit par microstimulation électrique à très bas courant. La seconde procédure expérimentale consiste à étudier les propriétés électrophysiologiques des neurones situés dans les territoires en question à la lumière des désordres provoqués par leur dysfonctionnement.

L'analyse extensive des répercussions comportementales entraînées par les perturbations et de leur évolution permet de révéler les régulations homéostatiques qui préservent une fonction vitale à la vie de relation (l'orientation), sa robustesse, sa résilience et sa plasticité.

Le nombre d'animaux que nous prévoyons d'utiliser pour mener à son terme le présent projet est de six.

La recherche répond aux exigences de réduction et de raffinement parce que d'une part les résultats des expérimentations seront publiés et que d'autre part elle a recours aux techniques de perturbation réversible (injection locale d'agent pharmacologique à action réversible, microstimulation électrique). A ce jour, le remplacement n'est pas encore envisageable car de nombreuses questions critiques restent encore sans réponse pour envisager la cessation du recours au primate non-humain et la complétion de cette neurophysiologie. Les réponses apportées par nos expérimentations et les interactions que nous développons avec des laboratoires utilisant l'insecte comme modèle animal sont la preuve que nous prenons ce remplacement très au sérieux. Mais les réponses apportées par cette recherche ne sont plus que fondamentales et d'une utilité moindre pour faire progresser la neurologie humaine.

9781 Les maladies transmises par les tiques, actuellement en pleine émergence, sont très nombreuses, provoquent une morbidité et une mortalité très importantes à travers le monde, et concernent à la fois les animaux et les hommes. A présent, la lutte contre les tiques est essentiellement basée sur l'utilisation d'acaricides qui, outre le fait d'atteindre la faune non cible, sont polluants pour l'environnement et pour les produits issus de l'élevage, et génèrent des résistances chez les tiques. Identifier de nouvelles méthodes de lutte contre les tiques représente donc une urgence à l'heure actuelle. Nos précédents travaux de recherche ont mené à l'identification de plusieurs molécules issues des glandes salivaires de la tique *Ixodes ricinus* qui sont impliquées à la fois dans la prise du repas sanguin et dans la transmission bactérienne tel que validé par des expériences de RNA interférence. Neutraliser de telles molécules par le biais d'une vaccination pourrait donc permettre d'empêcher ou de diminuer leur gorgement et de bloquer la transmission bactérienne lors de ce gorgement. Quatre de ces candidats ont d'ores et déjà été éprouvés dans le modèle souris quant à leur innocuité et leur immunogénicité dans ce modèle animal. L'objectif du présent projet est de valider, chez le mouton qui correspond à une espèce cible de la vaccination anti-tique recherchée, l'impact de ces candidats vaccinaux à la fois sur le gorgement des tiques et sur la transmission bactérienne.

L'ensemble du projet se réalisera sur un total de 48 moutons.

Les résultats obtenus dans le cadre de ce projet permettront d'une part d'augmenter les connaissances sur les modalités du gorgement des tiques et de la transmission d'agents pathogènes par ces dernières en analysant l'impact de la vaccination. D'autre part, ils permettront d'identifier des candidats vaccinaux afin de lutter contre *Ixodes ricinus*, qui représente, en Europe, le premier vecteur d'agents pathogènes responsables de maladies à la fois chez l'Homme et l'animal.

Remplacement : De telles expérimentations ne peuvent se faire que sur animaux vigiles. L'usage du mouton permet d'utiliser un grand nombre de tiques sans souffrance pour l'animal (pas de

problème de spoliation sanguine au vu de sa taille), et de viser une espèce cible de la vaccination anti-tiques en conditions réelles en cas de succès.

Réduction : Le nombre d'animaux utilisés est calculé au minimum pour obtenir des résultats interprétables en fonction de la variabilité individuelle de la réponse immune, soit 6 animaux par lot.

Raffinement : Les animaux seront suivis quotidiennement et seront équipés d'enregistreur de température en temps réel. Bien qu'aucune souffrance liée aux substances biologiques administrées (antigènes, adjuvant,) ne soit attendue, les animaux présentant une hyperthermie prolongée ou des signes cliniques seront présentés au vétérinaire pour être soignés. Concernant l'impact de la vaccination sur l'infestation par les tiques et la transmission bactérienne, le nombre de tiques, le nombre a été adapté de par nos expériences précédentes afin de limiter l'inconfort lié à une démangeaison trop intense due aux piqûres de tiques.

9782 La pratique clinique et l'utilisation de modèles animaux ont permis de montrer que l'acupuncture assistée par l'électricité (EA) peut réduire les symptômes douloureux. Cependant, les mécanismes permettant d'expliquer l'analgésie induite par l'EA ne sont pas déterminés. Il a par ailleurs été montré que les cannabinoïdes peuvent également induire une analgésie. Ainsi, le but de ce projet est de rechercher si les récepteurs aux cannabinoïdes sont impliqués dans l'analgésie induite par l'EA et d'en explorer les mécanismes sous-jacents.

La durée prévue pour ce projet est de 5 ans et sera réalisé chez la souris. Du fait de la complexité des mécanismes et des circuits neuronaux qui sont étudiés, ils ne sont conservés que chez les mammifères, y compris chez l'homme, mais absents ou très différents chez les invertébrés.

Nous prévoyons d'utiliser 600 souris avec différentes approches comme par exemple des tests comportementaux de douleurs avec plusieurs lignées des souris transgéniques. D'un point de vue méthodologique, nous nous engageons à respecter la règle des 3R (remplacement, réduction, raffinement) :

Remplacer : A ce jour, l'étendue des connaissances concernant l'organisation des circuits neuronaux conservés chez les mammifères y compris l'homme et surtout leur plasticité ne permet pas la conception et la mise en place de stimulations numériques fiables qui pourrait permettre d'étudier et de comprendre totalement les effets et les mécanismes complexes de l'électro acupuncture sur le système nerveux central qu'à partir de modèles animaux qui se mettent en place. Ainsi, l'usage des invertébrés qui ont un système nerveux complètement différent serait inapproprié. Dans ce contexte il demeure nécessaire d'avoir recours à l'expérimentation animale.

Réduire : Les animaux utilisés dans chacun des groupes expérimentaux n'excéderont pas 20 animaux c'est à dire le nombre minimal d'échantillons 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.

Le traitement statistique des données suit les conventions classiques en la matière, celui-ci étant réalisé sur la base de données extraite à partir de différents groupes d'animaux, chacun constitué d'un nombre n'excédant pas 20 animaux. Le nombre d'individu par groupes expérimentaux, permettront les analyses statistiques basées sur des tests non paramétriques (Wilcoxon, Mann-Whitney, Kruskal-Wallis, Friedman) seront privilégiées par rapport aux tests paramétriques (Anova, test de Student, etc.)

Raffiner : Afin de raffiner les conditions d'utilisation des animaux inclus dans l'étude, les cages d'hébergement seront enrichies de matériel de nidification, et le bien-être de l'animal sera suivi quotidiennement au cours de l'étude, dans le cas de procédures chirurgicales des protocoles correct d'anesthésie et d'analgésie seront appliqués. Les animaux seront suivi quotidiennement pour leur récupération post opératoires complet.

9783 Le foie est un organe vital qui intervient dans le stockage du glucose, la fabrication de la bile et la détoxification. L'incidence du cancer du foie est en forte augmentation depuis 20 ans. Les cancers du foie sont en général des carcinomes hépatocellulaires (CHC) se développant à partir des cellules majoritaires du foie : les hépatocytes. L'épidémiologie du CHC est dominée par les virus des hépatites B et C, la consommation excessive d'alcool et la stéatose hépatique (accumulation

excessive de gras dans le foie). Des études récentes ont permis de montrer que le développement du CHC est intimement lié à un contexte d'altérations génétiques favorisant un remaniement du cycle de division de l'hépatocyte. Malgré ces avancées, la dissection des événements précoces de la carcinogenèse hépatique, notamment comprendre la transformation tumorale des hépatocytes, est un enjeu majeur de santé publique pour comprendre la pathogénie sous-jacente de la maladie. Dans ce cadre notre équipe s'intéresse à décrypter les mécanismes cellulaires et moléculaires régulant le cycle de division des hépatocytes pour assurer ainsi le maintien de l'intégrité du tissu hépatique. Nous nous intéressons plus particulièrement aux conséquences de la perte d'expression de différents gènes clés, retrouvés mutés dans le CHC humain, sur la division des hépatocytes, par des approches conjointes de culture primaire d'hépatocytes et d'hépatectomies partielles dans des modèles murins.

Pour répondre à cette problématique, nous utiliserons plusieurs lignées de souris génétiquement modifiées et le nombre de souris utilisées sera au maximum de 330.

Les procédures expérimentales mises en jeu dans ce projet 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). Les groupes seront constitués du minimum d'animaux nécessaire et suffisant pour permettre une analyse statistique robuste des effets observés. Nous pourrions être amenés à manipuler moins de souris si l'effet observé s'avère significatif au cours des premières expériences. L'étude sera arrêtée si l'expérience initiale invalide l'hypothèse de travail. Les animaux sont observés quotidiennement afin de respecter leur bien-être. Les souris sont placées dans des conditions optimales (température, hygrométrie, cycle jour nuit 12h/12h, enrichissement des cages, nourriture ad libitum). Les manipulations seront réalisées dans le souci constant de réduire au maximum l'inconfort et la souffrance des animaux. Toute manipulation invasive (chirurgie) sera précédée d'une anesthésie générale et l'animal recevra un analgésique avant et après la chirurgie.

A la fin de la chirurgie, si l'animal est gardé en vie pour les besoins de l'expérimentation, il recevra un suivi particulier heure par heure après la chirurgie (période critique, risque d'hémorragie), puis toutes les 12 heures. Par ailleurs, de la nourriture et du gel à haute valeur nutritive seront fournis, ainsi que des moyens supplémentaires pour maintenir la température corporelle après la chirurgie. La mise en place d'une grille de suivi strict des points limites permettra d'éviter au maximum le stress et/ou la douleur au cours de l'expérimentation. Dans le cas où un point limite est atteint avant la fin de l'expérimentation, la mise à mort anticipée de l'animal sera faite. Enfin une veille scientifique continue sera effectuée, évitant ainsi toute expérimentation déjà rapportée dans la littérature.

Ainsi, les résultats de ce projet nous permettront de mieux caractériser les mécanismes sous-jacents à la prolifération des hépatocytes pour assurer l'intégrité génomique dans le foie, mécanismes faisant défaut au cours de l'hépatocarcinogenèse humaine. Ces travaux pourraient ainsi permettre le développement de nouveaux outils diagnostic/pronostic du développement du carcinome hépatocellulaire chez l'homme.

9784 Les glioblastomes sont les tumeurs primitives du cerveau les plus fréquentes chez l'adulte. Les traitements incluant la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie sont peu efficaces et ces tumeurs demeurent incurables, avec une courbe de survie inférieure à 15 mois.

Il est aujourd'hui admis que les cellules souches de gliomes (GiCs) sont responsables du développement de la tumeur et des récives. Fortement hétérogènes, les glioblastomes se composent d'une part, de territoires enrichis en cellules souches qui se multiplient activement et sont insensibles aux traitements, et d'autre part de zones différenciées, non proliférantes et sensibles aux chimiothérapies. Notre objectif est de contribuer à l'élaboration de nouvelles thérapies anti-cancéreuses en induisant la différenciation des GiCs et leur sensibilisation aux chimiothérapies conventionnelles. Pour cela, nous avons criblé une collection de composés chimiques in vitro puis dans des modèles 3D substitutifs qui permettent de réduire le nombre de sujets utiles lors de la phase d'expérimentation animale. Ainsi, nous avons identifié trois composés présentant un intérêt thérapeutique réel puisqu'ils sont capables d'inhiber la prolifération des GiCs, de stimuler leur différenciation et d'augmenter leur sensibilité au témozolomide, la chimiothérapie de référence pour

le glioblastome. Les tests de toxicité ont montré qu'aucun de ces composés n'induit la mort de cellules normales humaines souches et adultes aux doses efficaces sur les GiCs. Le composé le plus prometteur, DVXXX, est à cette heure testé au laboratoire pour son potentiel à inhiber l'initiation tumorale des GiCs in vivo. Ce nouveau programme a pour objectif de rechercher un mode d'administration du DVXXX efficace sur le développement de glioblastome chez la souris.

Dans cette perspective, une culture de GiCs rendues luminescentes sera greffée dans le cerveau (striatum droit) de souris femelles nude de 8 semaines, pour induire un développement tumoral que nous suivrons à l'aide d'un dispositif d'imagerie. Ce dispositif permet de réduire sensiblement le nombre d'animaux sans affecter la quantité de mesures. Une fois le greffon installé, les animaux recevront une injection intra péritonéale de DVXXX trois fois par semaine et l'impact de ce traitement sur la croissance de la tumeur sera suivi par imagerie et comparé à un groupe contrôle qui recevra à la même fréquence une injection de sérum physiologique. Les animaux seront maintenus vivants jusqu'au terme de l'expérience (52 semaines) ou l'apparition du point limite établi selon une grille de score garantissant la prévention de la souffrance animale.

Les hypothèses statistiques que nous avons formulées pour obtenir des résultats significatifs indiquent que 10 animaux seront nécessaires par condition expérimentale. Au total ce projet nécessitera 20 souris qui seront hébergées par trois ou quatre dans des cages comportant des matériaux propices à augmenter leur bien-être en leur permettant d'exercer les activités spécifiques à leur espèce. Les résultats permettront de déterminer si le DVXXX peut inhiber la croissance de tumeurs gliales après un traitement par voie intra péritonéale.

Dans la conception de notre projet nous avons attaché un soin particulier au respect de la règle des 3R en :

- Remplaçant autant que possible le recours à l'utilisation d'animaux par le développement de tests sur cultures cellulaires et ainsi que dans deux modèles tridimensionnels organotypiques substitutifs mimant l'interaction des cellules cancéreuses avec un tissu cérébral sain,
- Réduisant l'effectif au nombre de sujets strictement nécessaires à l'expérience par la recherche du meilleur compromis entre la grandeur de l'effet recherché et l'exigence d'une forte significativité expérimentale ainsi que par l'utilisation d'un dispositif d'imagerie du petit animal qui assure un suivi longitudinal de la croissance tumorale sans sacrifier d'animal à chaque point de mesure.
- Raffinant les conditions expérimentales par la mise en œuvre d'une prémédication préopératoire systématique garantissant la prévention de la douleur per- et post-opératoires ainsi qu'en adaptant la grille d'évaluation du bien-être animal aux spécificités du développement des tumeurs cérébrales. Ces expériences sont une nouvelle étape du développement préclinique du candidat médicament. De plus, l'étude du mécanisme d'action de ces composés éclairera sur les mécanismes moléculaires de la biogenèse du glioblastome, encore très peu connus.

9785 L'objectif de ce projet de recherche est d'identifier des composés chimiques ou biologiques qui pourraient être développés comme nouveaux médicaments dans le traitement des phénomènes d'hypersensibilité retardée. L'hypersensibilité fait référence à des réactions excessives, indésirables (dommageables, inconfortables, parfois mortelles) produites par le système immunitaire normal. Les réactions d'hypersensibilité retardée ont besoin d'un état immunitaire de l'hôte dit pré-sensibilisé. Les manifestations apparaissent dans un délai de 24 à 72 heures après la réintroduction de l'antigène dans l'organisme, d'où le nom d'hypersensibilité retardée. Elles se manifestent par une inflammation localisée au point d'injection pouvant aller jusqu'à une nécrose locale (exemple du test à la tuberculine).

Le phénomène d'hypersensibilité retardée est impliqué dans la pathogenèse de nombreuses maladies auto-immunes et aussi de maladies infectieuses comme la tuberculose, la lèpre, l'histoplasmosse, la toxoplasmosse, la leishmaniose, et les granulomes consécutifs à des infections et à des antigènes étrangers. Une autre forme d'hypersensibilité retardée est la dermatite de contact (exposition au poison du sumac vénéneux, aux produits chimiques, aux métaux lourds, etc...).

Des études in vitro sur cellules ont permis de définir un mécanisme d'action modulant la survie, la prolifération et la différenciation de cellules immunitaires spécifiques et ainsi de sélectionner des molécules pouvant être efficaces dans les phénomènes d'hypersensibilité retardée, voire dans les maladies auto-immunes. Il est nécessaire d'évaluer l'impact des meilleurs composés sélectionnés

dans un modèle in vivo d'hypersensibilité retardée. L'intérêt principal du modèle proposé dans ce projet est d'obtenir une réponse discriminante sur un modèle animal moins sévère qu'un modèle de développement au long cours de maladies auto-immunes. De plus, la réponse sera obtenue plus rapidement.

L'hypersensibilité sera induite chez le rongeur par deux administrations réalisées à 5-7 jours d'intervalle d'une métalloprotéine (KLH ou Keyhole Limpet Hemocyanin) capable de déclencher une inflammation. La première administration ou induction sera réalisée en 1 ou 2 points d'injection (par exemple, entre les omoplates et à la base de la queue), alors que la seconde se fera dans le pavillon de l'oreille. Les signes cliniques attendus sont modérés (rougeur et irritation au point d'injection, œdème de l'oreille).

Raffinement : les administrations douloureuses seront réalisées sous anesthésie et avec une analgésie adéquate. La survenue d'un signe clinique anormal fera l'objet d'une surveillance vétérinaire pour éviter toute souffrance sévère de l'animal. Des points limites sont mis en place et les animaux seront euthanasiés si les critères sont dépassés.

Une analyse statistique des données générées lors d'une étude pilote dans ce modèle rongeur nous permettra de réduire au minimum le nombre d'animaux à inclure dans l'étude pour obtenir une réduction de 50% de l'œdème ainsi qu'une diminution de 50% de l'infiltration de cellules immunitaires spécifiques. L'utilisation de publications scientifiques caractérisant ce modèle chez le rongeur nous guidera pour déterminer le nombre d'animaux inclus dans chaque groupe de l'étude pilote.

Pour une période de 5 ans, on peut estimer une utilisation de 500 rongeurs/an soit 2500 animaux au total pour ce projet.

9786 Les lymphomes sont des hémopathies correspondant à la transformation tumorale des lymphocytes B ou T. Il s'agit actuellement du 6ème cancer le plus fréquent en France. Les traitements reposent encore largement sur la chimiothérapie, qui ne permet de guérir qu'une fraction des patients, et entraîne des effets indésirables. Plus récemment, une thérapie ciblée a été mise sur le marché pour le traitement de certains lymphomes : l'ibrutinib, un inhibiteur d'une enzyme clé dans la cellule cancéreuse (BTK). Ce traitement a une grande efficacité, mais les patients rechutent encore souvent en raison d'une mutation du gène codant cette enzyme, qui protège les cellules cancéreuses de l'ibrutinib. Malheureusement, les patients dans cette situation n'ont que peu d'alternatives, et leur pronostic est très sombre.

Il est donc primordial de trouver d'autres molécules capables de cibler la BTK mutée afin d'augmenter l'espérance de vie des patients résistants à l'ibrutinib. Une nouvelle molécule que nous avons récemment testée semble intéressante pour notre projet. Nos résultats in vitro confirment l'intérêt majeur que pourrait avoir ce composé, mais nous devons maintenant démontrer cela dans un modèle plus proche de la clinique, à savoir des xénogreffes de lignées à des souris immunodéprimées.

Le nombre d'animaux utilisés sera réduit à son minimum tout en permettant une exploitation statistique des résultats.

Les conditions d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées seront appliquées dans le respect du bien-être animal, ceci afin de limiter au maximum les souffrances subies par l'animal. Des points limites adaptés associés à des procédures de surveillance des animaux ont été définis afin de limiter toute souffrance animale.

54 animaux seront nécessaires pour ce projet.

9787 La production d'insuline est assurée par les cellules β du pancréas. La destruction de ces cellules suite à l'émergence de réponses lymphocytaires cytotoxiques dirigées contre certaines molécules (préproinsuline, IA2, GAD, ZnT8, chromogranine) exprimées par ces cellules est à l'origine chez l'homme d'un diabète sévère insulino-dépendant ou diabète de type 1. Ces réponses sont liées à la présentation de fragments de ces molécules appelés peptides ou épitopes auto-antigéniques par les molécules HLA de classe I. L'identification de ces épitopes est donc d'intérêt diagnostique (ces réponses précèdent le diabète déclaré cliniquement) et physiopathologique (exacte compréhension des dérèglements immunologiques conduisant au diabète). Cependant l'analyse de ces réponses

à partir de prélèvements de patients se heurte à plusieurs difficultés, accès limité aux prélèvements, co-expression de plusieurs molécules HLA différentes par chaque individu, nombre élevé d'épitopes candidats à tester. Pour pallier ces difficultés et assurer une sélection préclinique des épitopes les plus prometteurs (de manière à concentrer sur ceux-ci les études menées à l'aide de prélèvements humains) des lignées de souris HLA classe I transgéniques et dépourvues de molécules murines de classe I ont été produites depuis 2009 dans le laboratoire. Ces lignées correspondent aux molécules HLA-A1, -A24, -B8, -B27, -B35, -B44 et -C7. Associées aux lignées HLA-A2 et -B7 que nous avons préalablement obtenues, l'ensemble de ces lignées est représentatif d'une large majorité d'individus des différentes populations humaines. Comme ces souris n'expriment à la surface cellulaire qu'une espèce de molécule d'histocompatibilité de classe I, la molécule HLA, elles permettront une identification non ambiguë reproductible dans des laboratoires différents des épitopes auto-antigéniques diabétogènes présentés par ces molécules aux lymphocytes T cytotoxiques.

Nous focaliserons notre attention sur la lignée HLA Cw7.1 parce que cet allèle est exprimé par un pourcentage très élevé d'individus (de 30 à 45% selon les groupes ethniques), parce qu'il fait partie de l'haplotype HLA de susceptibilité aux maladies auto-immunes (HLA DR3, B8, Cw7, A1), et parce que ces souris ont permis de définir, en collaboration avec un laboratoire étranger, le motif d'ancrage de peptides à HLA Cw7.1. Nous testerons par groupe de 6 souris les peptides potentiellement auto-antigéniques identifiés au sein des auto-antigènes majeurs du diabète de type 1 (préproinsuline, IA2, GAD, ZnT8, chromogranine) à l'aide de programmes prédictifs. Nous avons retenu 30 peptides candidats ce qui correspond à un besoin de 180 souris. A ces souris immunisées à l'aide de peptides s'ajoutent celles (90 souris par lignée) immunisées sous anesthésie générale à l'aide de vecteurs ADN (pour établir que ces épitopes auto-antigéniques sont bien naturellement apprêtés à partir des molécules auto-antigéniques entières) auxquelles s'ajoutent celles utilisées pour le maintien et le clonage in vitro des lymphocytes auto-réactifs, soit 100 souris supplémentaires. Au total 370 souris sont nécessaires pour le développement de ce projet. Afin de limiter le plus possible le nombre d'animaux utilisés, nous congèleront systématiquement une partie des splénocytes initialement récupérés, cellules susceptibles d'être réutilisées pour la dérive de lignées lymphocytaires spécifiques des peptides auto-antigéniques identifiés sans avoir à refaire l'expérience initiale ad integrum.

Un criblage exhaustif à l'aide des souris HLA, pouvant être confirmé dans des laboratoires distincts, permet de mieux cibler et limiter les études humaines. Ces techniques expérimentales communément utilisées sont habituellement sans conséquences dommageables pour les souris. Si une souris (les animaux étant examinés tous les 2 jours) présentait des signes pathologiques, apathie, poil ébouriffé, perte de poids, elle serait mise à mort.

Il convient de souligner que cette lignée HLA Cw7.1, comme les autres lignées préalablement évoquées, de souris HLA transgéniques sont également d'intérêt dans le cadre des autres pathologies auto-immunes comme dans celui des pathologies humaines tumorales et infectieuses où elles devraient permettre aux laboratoires qui le souhaiteront d'aider à la valorisation préclinique de candidats vaccins.

9788 La fibrose pulmonaire idiopathique est une maladie pulmonaire progressive, irréversible et mortelle. Elle se caractérise par des dépôts excessifs de matrice extracellulaire et de fibroblastes pulmonaires, conduisant à une réduction de l'élasticité pulmonaire et à une destruction des alvéoles pulmonaires. La fibrose pulmonaire idiopathique serait la conséquence d'agressions répétées de l'épithélium des alvéoles pulmonaires. Ces phénomènes conduiraient à des anomalies de communication entre les fibroblastes pulmonaires et les cellules épithéliales alvéolaires et à la genèse de la fibrose pulmonaire. Au cours de ce processus il existe une réactivation de voie de signalisation impliquées dans le développement pulmonaire comme la voie des Fibroblast Growth Factors. Cette famille est composée de 22 membres et de 5 récepteurs (FGFR1-4 et un récepteur soluble FGFL1). L'implication de plusieurs membres de cette famille, dans la genèse de la FPI, a déjà été démontrée dans le passé. En effet, le nintedanib est un traitement anti-fibrosant validé dans la FPI qui cible les récepteurs des FGF à l'exception de FGFR4.

Plusieurs données préliminaires in vitro et issues de la littérature nous amènent à penser que le récepteur FGFR4 pourrait avoir des propriétés anti-fibrosantes. Ainsi, son inhibition aggraverait la fibrogenèse alors que son activation pourrait la prévenir ou tout du moins la limiter. Cette hypothèse a été vérifiée sur des expériences préliminaires in vitro portant sur des fibroblastes pulmonaires. L'objectif de ce projet est de confirmer ces résultats dans un modèle plus complexe se rapprochant le plus possible de la pathologie de nos patients. Le modèle souris est pertinent du fait de sa petite taille, et du fait de son système respiratoire qui est très similaire à celui de l'Homme. De plus, les souris offrent la possibilité de travailler sur des organismes génétiquement modifiés et de cibler le rôle d'une molécule en particulier dans le poumon. A ce titre, les souris déficientes à l'état homozygote du gène *Fgfr4* ne présentent pas de phénotype pulmonaire particulier. L'exposition pulmonaire à la bléomycine ou à une molécule, le TGF β délivrée par un virus sont des modèles établis de fibrose pulmonaire chez la souris.

Nous testerons notre hypothèse, en instillant de la bléomycine par voie intra-trachéale ou un adénovirus recombiné surexprimant du TGF β chez des souris préalablement anesthésiées.

Dans une première série d'expérience, nous étudierons l'expression de FGFR4 et de ses ligands au cours du développement de la fibrose. Puis nous évaluerons l'effet de l'inhibition ou de l'activation pharmacologiques de FGFR4 via un inhibiteur et un activateur de FGFR4. Ces molécules seront administrées par voie intra-nasale pendant la phase fibrosante (J7) après anesthésie courte des animaux. Enfin, la cinétique et le développement de la fibrose chez des souris déficientes pour le *Fgfr4* seront évalués.

Les souris C57Bl6 seront euthanasiées à J3, J7, J14 et J21 après anesthésies profondes. Un lavage bronchiolo-alvéolaire sera réalisé, le bloc cœur poumon sera prélevé en vue d'analyser la morphologie pulmonaire, de quantifier l'expression protéiques et l'expression de l'ARN messager par PCR de FGFR4 et de ses ligands, des protéines de la matrice extracellulaire, les cytokines pro- et anti-fibrosantes, les marqueurs d'apoptose et d'autophagie et enfin d'analyser les metalloprotéinases par zymographie.

Après analyse statistique le nombre de souris nécessaire pour mener à bien ce projet est de 944 animaux. En vue de préserver au maximum le bien-être animal, les animaux seront laissés au repos 7 jours avant les expérimentations. Les cages seront enrichies et changées de façon régulières. Pour limiter la souffrance animale, cette dernière sera évaluée de façon quotidienne. Plusieurs points limites ont été définis comme la perte de poids >20% en quelques jours, l'anorexie ou la difficulté de déplacement, l'existence d'automutilations, de poils hérissés ou d'un abdomen distendu ou la survenue de diarrhée, de saignement persistants ou de tout autre signes conduisant selon l'expérimentateur à un état moribond conduiront à pratiquer une euthanasie de l'animal. D'autre part afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, nous mettrons en culture, les cellules épithéliales alvéolaires et les fibroblastes pulmonaires murins.

La durée de ce projet sera de deux ans.

9789 L'Organisation Mondiale de la Santé estime pour l'an 2020 le nombre annuel d'individus (i) infectés par *Mycobacterium tuberculosis* à un milliard, (ii) développant une tuberculose pulmonaire à 200 millions, et (iii) morts dus à cette maladie à 35 millions.

La compréhension des mécanismes du développement d'une tuberculose évolutive et l'interaction du système immunitaire de l'hôte avec des mycobactéries est essentielle. Par ailleurs, les effets de l'histoire infectieuse des individus sur leurs réponses immunitaires à un organisme pathogène ne sont pas bien compris. Des infections concomitantes ou séquentielles par des micro-organismes distincts peuvent mutuellement influencer leur pouvoir pathogène respectif : (i) en affectant les tissus eux-mêmes, (ii) en induisant des réponses immunitaires à reconnaissance croisée, ou (iii) en influençant l'immunité innée, qui à son tour peut affecter l'activation des cellules présentatrices d'antigène et l'induction de l'immunité adaptative.

Nous avons précédemment montré que la présence d'une pré-colonisation naturelle par des *Helicobacter*, favorise la sévérité des lésions pulmonaires induites par *M. tuberculosis* chez la souris *Mus musculus*. Si l'infection par des *Helicobacter* est un facteur aggravant la tuberculose chez l'homme, il sera très important d'en comprendre les mécanismes car *M. tuberculosis* infecte de façon latente le tiers de la population mondiale alors que l'infection par *H. pylori* touche la moitié de

la population mondiale. Nous nous proposons d'étudier les mécanismes d'aggravation de la tuberculose liée à l'infection par des *Helicobacter* dans le modèle souris. En nous basant sur nos observations précédentes, nous étudierons les influences d'une pré-colonisation par *Helicobacter hepaticus* ou *H. pylori*, expérimentalement induites dès la vie périnatale, ainsi que les impacts de l'inflammation chronique qui en résulte sur la sensibilité à développer des lésions pulmonaires tuberculeuses. Des souris femelles ou mâles feront partie de cette étude. Deux cent vingt-six (226) souris seront nécessaires pour les mises au point expérimentaux, ainsi que la reproduction des résultats.

La procédure consistera à induire une pré-colonisation par des *Helicobacter* (gavages gastriques par *Helicobacter* chez souris femelles gravides, ainsi que chez leurs nouveau-nés. Si des pré-colonisations sont efficacement établies, les souris seront soumises à un challenge par aérosol pour recevoir une faible dose de *M. tuberculosis*.

Nous n'avons pas observé précédemment et nous n'attendons pas de morbidité, ni de signe extérieur de souffrance animale chez des souris immunocompétentes soumises à des infections chroniques par *H. pylori* ou *H. hepaticus*.

Nous n'avons pas observé précédemment et nous n'attendons pas de morbidité, ni de signe extérieur de souffrance animale chez des souris immunocompétentes soumises à un challenge par la voie aérosol avec une faible dose de *M. tuberculosis*, souche de laboratoire H37Rv, dans les durées d'expérience que nous planifions.

En vue de « Raffiner » nos expériences, chez les souris co-infectées par des *Helicobacter* et *M. tuberculosis*, une surveillance à raison de 3 fois par semaine sera mise en place à partir d'un mois après le challenge par *M. tuberculosis*. Cette surveillance sera assurée par le concepteur du projet ou les doctorants ou des chercheurs contractuels qui travaillent directement sur ce projet. La surveillance sera également assurée par les techniciens animaliers qui sont en charge de nettoyer les cages et qui sont présents dans l'espace de l'animalerie tous les jours. De plus, des vétérinaires effectueront des visites ponctuelles et hebdomadaires des animaux. La cage des souris comportera des éléments d'enrichissement, coton dentaire pour que les animaux puissent construire un nid.

En cas d'observation de la souffrance des animaux, pour que celle-ci soit minimisée, tout en respectant les conditions qui permettent le projet de recherche d'atteindre ses objectifs, nous planifierons à l'avance de mettre à mort les animaux présentant les signes cliniques de morbidité.

Les signes de morbidité suivants seront suivis :

- poils ébouriffés,
- dos voûté,
- prostration,
- cachexie.

Les souris co-infectées seront suivies tous les jours à partir d'un mois post-challenge. Si des signes de morbidité sont observés chez un animal, il sera mis à mort.

Afin de « Réduire » le nombre d'animaux utilisés dans ce projet, basé sur les tests statistiques, nous avons planifié d'inclure le nombre minimal d'individus/groupe expérimental qui permette une analyse statistique pertinente et concluante. De par notre expérience précédente, très peu de mises au point sont nécessaires

Aucun modèle *in vitro* ne permet à ce jour d'étudier la pathogenèse à l'infection par les *Helicobacter* ou par *M. tuberculosis* et encore moins aux deux infections de façon concomitante. La stratégie de « Remplacement » consiste ici à utiliser le modèle souris, car cette espèce est relativement résistante à l'infection par *M. tuberculosis*, ce qui minimise la souffrance animale tout en évitant d'utiliser des animaux de plus grande taille et de plus grande sensibilité à l'infection par *M. tuberculosis*, tel que le cobaye.

9790 Le choc septique est le stade le plus grave d'une infection. Il constitue un motif fréquent d'admission en réanimation et est responsable chaque année de nombreux décès (40%) malgré une prise en charge optimale.

Le choc septique est caractérisé par une inflammation généralisée (systémique) majeure et une altération de la fonction des organes vitaux, conduisant au décès. Le choc septique va également

être responsable d'une dérégulation de la glycémie (taux de sucre dans le sang), responsable d'une surmortalité des patients. Cette dérégulation est liée notamment à une résistance à l'insuline.

Notre projet cherche donc à décrire les fonctions cellulaires du pancréas, responsables de la sécrétion d'insuline, dans un modèle de choc septique chez le rat. Nous testerons ensuite de nouvelles molécules commercialisées dans certains pays pour leur effet antidiabétique, afin de déterminer si elles permettent un meilleur contrôle glycémique, mais également qui pourraient diminuer l'inflammation délétère du choc septique. L'objectif est in fine de trouver un traitement afin d'optimiser le contrôle glycémique des patients en choc septique et de réduire l'inflammation excessive responsable des défaillances d'organes et du décès du patient.

L'ensemble de ce projet nécessitera au maximum 480 rats et prend en compte le respect de la règle des 3R.

Réduire : Le nombre d'animaux utilisés lors des expériences sera réduit au minimum nécessaire, avec la contrainte d'obtenir des données statistiquement significatives (t-test, one-way ou two-way ANOVA selon les expériences). 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 :

- des traitements antalgiques seront administrés
- les conditions d'hébergement des animaux seront adaptées à leur état

Remplacer : Le remplacement du modèle animal par un autre modèle n'est pas possible du fait que les effets d'un choc septique sur l'ensemble de l'organisme sont des processus complexes issus des interactions multi-tissulaires dans l'organisme et surtout l'effet d'un choc septique sur les îlots pancréatiques nécessite un modèle animal et non cellulaire pour être établi. Cependant, l'identification préalable des mécanismes moléculaires probablement impliqués a été faite à l'aide de méthode alternative (modèle de cultures cellulaires stimulées par une endotoxine).

9791 Les biofilms bactériens sont généralement définis comme des agrégats de cellules bactériennes attachés à une surface et enrobés d'une matrice visqueuse. 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.

De nouvelles molécules à activité anti-biofilm sont actuellement en cours de développement in vitro. Avant de pouvoir tester leur efficacité chez l'animal, des études de pharmacocinétique (étude du devenir du médicament dans l'organisme) doivent être conduites. Dans cette étude, nous étudierons la pharmacocinétique sanguine de quatre molécules d'intérêt (nommées BFP1, BFP2, BFP3 et BFP4) chez la souris après administration unique intrapéritonéale. Pour cela, du sang sera prélevé sur animal anesthésié à différents temps.

Pour ce projet, 96 souris balb/c (femelles de 8 semaines) seront nécessaires.

La mise en place de ce projet s'est attachée à respecter la règle des 3R. Tout d'abord, le nombre d'animaux par point sera de 3 (par point et par composé) au lieu de 5, ce qui permet de réduire grandement le nombre d'animaux de l'étude. En revanche, une étude de pharmacocinétique ne pouvant s'affranchir de l'utilisation d'organismes vivants, aucune alternative de remplacement ne peut être envisagée. Enfin, un enrichissement du milieu (jouets en plastique, igloos en carton) sera utilisé et une surveillance continue (étude sur 6h) sera également réalisée pour cette étude. Les prélèvements sanguins seront réalisés sous anesthésie générale et les doses testées pour ces quatre molécules seront des doses non toxiques.

9792 La rétine est un tissu neuro-épithélial tapissant le fond interne de l'œil et organisé en différentes couches cellulaires qui sont essentielles pour la vision. Parmi ces couches, les photorécepteurs et l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) sont à l'origine de la transformation du stimulus lumineux en influx nerveux. Ces deux types cellulaires sont étroitement liés physiquement et fonctionnellement.

La maladie juvénile héréditaire de Stargardt est due à des effets toxiques de la lumière et affecte 1-5 personnes sur 10000. Nous avons récemment démontré l'efficacité de petites molécules synthétiques dans la protection des photorécepteurs et de l'EPR en culture dans des conditions pathologiques. Ces résultats sont très prometteurs mais l'étude sur l'animal est une étape préalable aux essais cliniques. Il s'agit donc de développer un projet translationnel chez la souris.

Notre objectif sera d'évaluer le potentiel thérapeutique d'une nouvelle molécule « phare » dans le traitement d'une lignée de souris modèle de la maladie de Stargardt. Nous mesurerons donc la perte des photorécepteurs induite par la lumière et liée à l'âge et la protection apportée par cette molécule.

Notre projet prévoit deux phases avec des modes d'administration différents (voies intraveineuse et orale) et des traitements à court et moyen termes. Nous avons estimé que pour un projet de 2 ans, environ 175 souris seront nécessaires pour la première phase (traitement à court terme) et 126 pour la deuxième (traitement chronique), soit un total de 301 souris. Le risque de cette recherche est l'absence d'effet de la molécule testée. La phase à court terme du projet permettra rapidement d'évaluer le bénéfice du traitement. En cas d'absence d'effet ou d'effets adverses pour les souris, une interruption du projet permettra de limiter le nombre d'animaux.

Pour respecter la règle des 3R, le recours à la souris modèle est incontournable dans une perspective thérapeutique. Nous limiterons le nombre d'animaux utilisés pour les expériences au minimum nécessaire pour une évaluation statistique de l'effet du composé testé. En développant des procédures appropriées les moins invasives car dérivées de techniques cliniques considérées comme indolores en ophtalmologie humaine, nous éviterons les points limites, et l'observation régulière des animaux (prise alimentaire, hydrique, comportement social et activité circadienne) et des mesures biologiques (poids, fonction visuelle) après chaque expérimentation permettra de juger de la nécessité d'interrompre l'expérimentation. Pour ces explorations, une anesthésie des souris sera réalisée à l'aide d'une anesthésie général et oculaire.

9793 La radiothérapie est une technique majeure dans le traitement des cancers. Elle consiste en l'utilisation de rayonnements ionisants afin d'induire des dommages de l'ADN létaux pour les cellules tumorales. Malheureusement, dans 1% à 2% des patients, des seconds néo-cancers radio-induits se développent en bordure du territoire irradié, notamment des sarcomes au pronostic très défavorable. L'objectif du projet est d'étudier les mécanismes d'émergence de ces seconds néo-sarcomes, pour à terme mettre au point des méthodes pour les prévenir.

L'hypothèse que nous proposons de tester dans ce projet est que lors d'une radiothérapie, les particules ionisantes qui diffusent depuis la tumeur irradiée vers le tissu sain péri-tumoral pourraient générer au sein des cellules qui le composent des petites cassures de l'ADN (cassure simple-brin) susceptibles d'entraîner un vieillissement cellulaire prématuré. Ces cellules auraient alors une probabilité augmentée d'acquies des mutations et donc de générer un second néo-cancer.

La validité de cette hypothèse a été d'ores et déjà testée en utilisant des cellules humaines en culture : des fibroblastes de derme. Nous avons donc déjà répondu à l'exigence de remplacement. L'objectif est maintenant de confirmer les résultats in vivo chez la souris et surtout de démontrer que ce mécanisme peut en effet conduire au développement de cancers, au sens clinique et anatomopathologique du terme, ce que l'on ne peut pas appréhender avec des cellules en culture. Notre projet s'organisera en 4 étapes. Les trois premières étapes sont préparatoires à la dernière. Elles ont pour objectif de vérifier les résultats obtenus avec les cellules en culture et de déterminer la cinétique des événements chez l'animal. Ces 3 étapes préalables seront peu consommatrices d'animaux (84 souris) car elles utiliseront notamment un modèle de souris transgénique permettant le suivi du vieillissement cellulaire en temps réel par bioluminescence sur animal vivant. La dernière étape sera celle qui permettra de confirmer ou d'infirmer que les cancers secondaires post-radiothérapie se sont bien formés à partir de cellules entrées en sénescence prématurée suite à la radiothérapie. Elle permettra aussi de tester si la survenue de ces cancers secondaires peut être prévenue en utilisant des drogues sénolytiques (inductrice de mort des cellules sénescents). Cette étape ne sera réalisée que si les résultats des 3 étapes préalables sont positifs. Nous répondons ainsi à l'exigence de réduction. La formation des seconds cancers post-radiothérapie étant un événement rare, 600 animaux seront nécessaires à cette étape. Afin de répondre à l'exigence de

raffinement, les animaux seront anesthésiés ou tranquilisés à toutes les étapes génératrices de stress (irradiation, mesure de bioluminescence, transport). De plus, étant donné que nous cherchons à expliquer la survenue de cancers en marge d'un territoire traité, nous n'irradierons pas les souris directement. Nous irradierons un gel placé en étroit contact avec l'animal. Ainsi l'animal ne recevra que les particules ionisantes qui diffuseront depuis ce gel et qui pourraient être à l'origine du développement d'un sarcome secondaire. Pendant la période d'observation de développement des cancers radio-induits, les souris feront l'objet d'une surveillance par du personnel qualifié afin de détecter toute cause de souffrance. Elles seront sacrifiées dès que les tumeurs seront détectées.

9794 La stéatopathie non alcoolique (Non-alcoholic Fatty Liver Disease ou NAFLD) est la manifestation hépatique du syndrome métabolique et l'une des maladies du foie les plus courantes dans les pays développés. Cette pathologie se réfère à un large éventail de dommages au foie, allant de la stéatose pure à une pathologie plus grave, à savoir la stéatohépatite (NASH) caractérisée, en plus de la stéatose, par une inflammation et une fibrose. La NAFLD, qui affecte jusqu'à 30% de la population générale, est souvent associée avec l'obésité, et la prévalence augmente avec l'obésité morbide et le diabète de type 2. La progression vers la NASH est influencée par la persistance et la gravité de la cause initiale de la stéatose hépatique. L'importance clinique de la NASH est liée à son risque de progresser vers la cirrhose et même le carcinome hépatocellulaire. Etant donnée l'augmentation drastique de l'incidence de l'obésité au cours des dernières décennies, le traitement de la NAFLD devient un défi majeur pour la santé publique.

Les données récentes de la littérature suggèrent que le sulfure d'hydrogène joue un rôle important dans la physiologie et la pathologie du foie. Le sulfure d'hydrogène est une molécule de signalisation endogène chez les mammifères, biosynthétisé lors du métabolisme des acides aminés dans les tissus de l'organisme et par le microbiote intestinal. Les données de la littérature indiquent que l'altération du métabolisme endogène du sulfure d'hydrogène est corrélée chez l'Homme avec les symptômes du diabète et la cirrhose du foie. De plus, il a été rapporté une diminution de la biosynthèse hépatique du sulfure d'hydrogène dans les modèles animaux de NAFLD. L'administration de molécules donneuses de sulfure d'hydrogène peut prévenir le développement de la NASH dans ces modèles animaux mais les mécanismes responsables des effets bénéfiques du sulfure d'hydrogène ne sont pas élucidés.

L'objectif du projet est d'étudier 1/ l'importance physiopathologique du métabolisme du sulfure d'hydrogène, tout particulièrement dans le foie, dans différentes situations (état nourri, jeûne, réalimentation après un jeûne, obésité) et 2/ les mécanismes mis en jeu lors d'une modification du métabolisme du sulfure d'hydrogène. Le projet implique un nombre total de 832 souris et implique plusieurs modèles animaux de NAFLD : des souris sauvages ayant une NAFLD induite par des régimes nutritionnels (régime gras, régime déficient en méthionine et choline) et des souris génétiquement obèses. Ces souris seront utilisées pour des analyses non invasives incluant un traitement avec des molécules de sulfure d'hydrogène et certaines recevront des isotopes stables. Ce projet, d'une durée de 5 ans, permettra de mieux comprendre les interrelations entre métabolisme hépatique du sulfure d'hydrogène et NAFLD dans des modèles animaux de cette pathologie.

Pour respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum mais suffisant pour permettre des analyses statistiques valables entre les différentes conditions. L'étude du rôle du sulfure d'hydrogène dans le développement de la NAFLD nécessite le recours à des modèles in vivo mimant le plus fidèlement la pathologie humaine puisque la NAFLD est un phénomène qui prend place au sein d'un organe entier, à savoir le foie, très souvent dans un contexte in vivo d'obésité. La réalisation d'explorations fonctionnelles sur animal vigile ne peut donc pas être substituée par des approches in vitro, qui par ailleurs ne peuvent pas reproduire les différents stades de développement de la NAFLD (foie stéatosé, NASH). De plus, afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligée aux animaux, les animaux seront observés quotidiennement et évalués à l'aide de points limites bien définis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire.

Ce projet apportera des données importantes sur le rôle du métabolisme du sulfure d'hydrogène dans le développement de la NAFLD, et d'identifier de nouvelles pistes thérapeutiques pour le traitement de cette pathologie.

9795 La dialyse péritonéale chez l'homme est le traitement le plus avantageux pour les patients dont la fonction rénale est trop dégradée pour la survie. Le processus est simple et le patient peut grâce à une machine, faire sa dialyse (nettoyage pour élimination des déchets du sang) à la maison. L'altération de la membrane péritonéale de la cavité abdominale par épaissement/établissement d'une fibrose bloque ce processus de filtration et est une des causes conduisant à une remise en cause de la dialyse péritonéale chez certains patients conduisant ce dernier à l'hémodialyse nécessitant de se déplacer à l'hôpital 3 fois par semaine pour quelques heures, ou à la greffe de reins. Les mastocytes (MC) sont des cellules du système immunitaire jouant un rôle de sentinelle dans la défense du corps humain face aux pathogènes. En effet, en tant que cellule en première ligne de défense du corps humains, les mastocytes sont capables de déclencher des réponses inflammatoires. Les basophiles sont des cellules circulantes partageant certaines caractéristiques avec les MC et sont connus pour répondre aux pathogènes bactériens. En conditions normales, les basophiles ne sont retrouvés que dans le sang.

Comprendre les mécanismes impliqués dans l'induction de cette fibrose conduisant à l'arrêt de la dialyse péritonéale est donc un enjeu majeur de santé public qui permettra de pouvoir prolonger la dialyse péritonéale dans le temps et ainsi augmenter le bien-être de vie du patient. Ces altérations sont associées avec une exposition répétée au liquide dialyse dans le temps et les épisodes de péritonites.

Suite à un signal de danger, les macrophages du système immunitaire résidents et ceux recrutés dans les tissus suite à la réaction inflammatoire matures localement et acquièrent soit un phénotype pro-inflammatoire (M1) ou soit anti-inflammatoire (M2). Les macrophages de type M2 ont un rôle dans la réparation tissulaire mais contribuent également à la fibrose associée. Les mastocytes sont une des cellules prédominantes de la cavité péritonéale. Notre question posée est donc d'étudier si les mastocytes d'une part, et les basophiles d'autre part, sont impliqués dans l'accumulation péritonéale des macrophages M2 au cours de la dialyse péritonéale, et si un évènement infectieux contribuerait, via ces cellules, à l'accumulation et à l'activation pro-fibrosante de ces macrophages M2. Nous proposons de : 1- Caractériser le rôle des mastocytes et des basophiles dans l'établissement de la fibrose de la membrane péritonéale dans un modèle de dialyse péritonéale chez la souris. 2- Etudier l'influence d'épisodes infectieux bactériens dans ce modèle sur la fibrose du péritoine puisque ces épisodes infectieux sont souvent retrouvés chez les patients, et l'interrelation des macrophages M2, des mastocytes et des basophiles dans ce contexte. Le prélèvement de membrane péritonéale chez le patient est impossible. De même, un prélèvement des cellules de la cavité péritonéale au cours du temps chez les patients n'est pas réalisable. Travailler sur la souris nous permettra de modéliser la dialyse, les conséquences de la dialyse aux différents stades afin de mieux comprendre les processus physiologiques et permettre de trouver un moyen d'éviter cette fibrose chez le patient afin d'augmenter son confort face à la maladie. De plus, la cavité péritonéale contient de nombreuses cellules du système immunitaire qui interagissent et s'influencent toutes entre elles. Un travail in vivo est donc indispensable pour comprendre le mécanisme dans son ensemble, l'influence des recrutements cellulaires. Le travail sur animaux permet donc de mieux entre-apercevoir ces processus biologiques. Nous travaillerons donc avec des souris *Mus musculus* C57Bl/6 sauvage, des souris RMB de fond génétique C57Bl/6 (car cette souris génétiquement modifiée nous permet d'éliminer sans douleur pour l'animal, par simple injection de toxine diphtérique tous les mastocytes) et des souris Mcpt8-CRE-DTA (car cette lignée de souris ne possède pas de basophiles et cela nous permettra d'étudier l'influence des basophiles). Ces 2 lignées de souris génétiquement modifiées sont déjà connues dans le monde scientifique et leur phénotype est non dommageable). Pour réaliser ce projet nous utiliserons 190 animaux répartis de la façon suivante : 1) Mise en place du modèle de dialyse péritonéale chez la souris afin de mimer l'évolution physiologique trouvée chez les patients (combien de temps injecter du liquide de dialyse afin de mimer la dialyse quotidienne des patients). 2- Rôle des mastocytes dans la fibrose induite lors d'un modèle de dialyse péritonéale chez la souris (souris génétiquement modifiées qui

auront ou pas la population mastocytaire dans la cavité péritonéale afin de voir les conséquences et leur rôle). 3- Conséquences d'évènements infectieux sur la fibrose péritonéale dans le modèle de dialyse péritonéale chez la souris (un épisode infectieux avec une bactérie tuée par la chaleur sera induit chez la souris afin de mimer les péritonites du patient et voir si cet événement infectieux accélère ou non l'altération de la membrane péritonéale. Ceci n'est pas réalisable sur un patient et requiert une fois encore l'utilisation du modèle animal). Ce projet est conforme aux règles des 3R en limitant (réduire) 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 processus de dialyse et de la complexité de la réponse immunitaire globale dans son ensemble, nous étudierons in vitro les conséquences biologiques et mécanistiques de l'interaction entre mastocytes et macrophages à l'aide de modèle de culture cellulaire, mais il n'est pas possible de remplacer ce modèle animal de dialyse par d'autres modèles.

9796 L'objectif de ce projet est de tester l'efficacité thérapeutique de composés chimiques ou biologiques dans un modèle reproduisant la pathologie humaine de cholestase intrahépatique. La cholestase correspond à une diminution ou disparition totale de l'écoulement de la bile en provenance du foie, générant une augmentation subite du volume de bile dans les voies biliaires intrahépatiques. Elle est souvent due à une obstruction sur le trajet d'évacuation normal de la bile ou à une maladie hépatique, le plus souvent une tumeur, une infection ou des calculs biliaires. Les premiers symptômes qui apparaissent sont une jaunisse et des démangeaisons inexplicables. Les dosages sanguins mettent en évidence une augmentation de la phosphatase alcaline, de la bilirubine, des acides biliaires et souvent des transaminases, indiquant un dysfonctionnement hépatique. L'induction de la cholestase chez la souris peut se faire de deux manières différentes, soit par administration orale d'un produit chimique toxique pour les cellules épithéliales biliaires comme l'ANIT (Alpha Naphthyl Iso Thiocyanate), soit par ligature du canal cholédoque via une chirurgie pratiquée sous anesthésie générale assortie d'une analgésie pré- et post-opératoire. Dans les deux cas, une altération de l'élimination des acides biliaires du foie vers le duodénum est observée. Afin de se protéger de la toxicité des acides biliaires s'accumulant dans le foie, les hépatocytes réagissent en exportant les acides biliaires et la bilirubine dans le sang. La pathologie est confirmée par une augmentation du taux circulant d'acides biliaires, un paramètre utilisé comme marqueur précoce de la cholestase en diagnostic clinique chez l'homme. Dans le cas de la ligature du canal cholédoque, la cholestase s'installe de manière plus intense et plus rapide que dans le modèle ANIT, et les taux sanguins d'acides biliaires et de bilirubine sont fortement augmentés dans les 5 jours qui suivent la chirurgie. Ce protocole permet donc de reproduire le stade tardif de la pathologie humaine caractérisée par une dégradation de la fonction hépatique qui nécessite à moyen terme une transplantation du foie comme ultime recours en l'absence de traitement efficace à ce jour. Le recours à ces deux modèles animaux se justifie par l'absence de tests in vitro ou ex vivo permettant de récapituler cette pathologie, à un stade précoce ou tardif (absence de méthode de remplacement). Les signes cliniques attendus sont une perte de poids conséquente avec apparition d'une jaunisse chez les souris ayant subi une ligature du canal cholédoque. Pour le modèle ANIT, aucun signe clinique visible n'est attendu hormis une perte de poids qui se stabilise au cours du temps, alors que l'analyse sanguine permet de démontrer l'installation progressive d'une cholestase. Les composés chimiques ou biologiques à évaluer seront administrés par toute voie et fréquence possible en fonction de leurs paramètres pharmacocinétiques, et le choix du modèle sera dicté en fonction du mécanisme d'action des composés à tester. Raffinement : La chirurgie pour le modèle chirurgical est réalisée sous anesthésie et avec un protocole analgésique approprié. Une observation quotidienne des animaux sera réalisée afin de noter tout signe clinique anormal, et un avis vétérinaire sera demandé en cas de doute. En cas de signes cliniques de souffrance au-delà de ceux attendus, des points limites seront mis en œuvre.

Réduction : Une analyse bio-statistique des données générées dans ces modèles a déjà été réalisée, afin d'inclure le minimum requis d'animaux par groupe pour obtenir une réduction significative de la cholestase.

Ce projet nécessitera une utilisation moyenne de 150 souris par an (soit 3 composés testés à 2 doses par année), donc 750 animaux au maximum pour la durée totale du projet sur 5 ans.

9797 En France, le cancer touche chaque année 355000 personnes et représente la première cause de décès. Les principaux facteurs de risque des cancers sont le tabagisme, l'alcool et la nutrition. Bien que de nombreux progrès aient été réalisés au cours de ces dernières années, il reste important d'identifier de nouvelles voies impliquées dans cette pathologie. En effet, une meilleure compréhension de la mise en place de cette pathologie ainsi que l'identification de nouveaux moyens de la combattre sont des enjeux majeurs qui permettront de caractériser de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles.

Le cancer regroupe un ensemble de maladies très complexes et très variées. Cependant, les cancers ont des particularités qui leurs sont propres telle que leur façon de produire leur énergie. Ainsi, un des traitements possibles contre le cancer consiste à interférer avec le métabolisme des cellules cancéreuses. Nos travaux antérieurs ont permis de montrer qu'une modulation du métabolisme global de l'organisme, en modifiant le régime alimentaire, permet de limiter le développement du cancer. En effet, nous avons déterminé qu'une réduction partielle de la quantité de protéines présentes dans la nourriture ralentit largement le développement du cancer via la mise en place d'une réponse immunitaire anti-tumorale.

Notre projet vise à déterminer comment un régime alimentaire appauvri en protéines permet la mise en place d'une réponse immunitaire anti-tumorale. Notre objectif est donc de mettre en évidence les voies de signalisation liant le régime alimentaire et la réponse immunitaire. Cela nous permettra de définir de nouvelles voies de signalisation qui représenteront autant de nouvelles cibles thérapeutiques contre les cancers. Notre étude repose sur l'utilisation de plusieurs modèles expérimentaux de souris immunocompétentes nourries avec différents régimes alimentaires et qui recevront des cellules tumorales. Ce projet est soutenu financièrement par des organismes de recherche publics et privés.

Remplacement : Comme notre projet repose sur l'influence des régimes alimentaires sur le dialogue entre système immunitaire et cellules cancéreuses, il n'existe pas à ce jour d'autre alternative que l'utilisation des souris pour l'étude in vivo des mécanismes moléculaires impliqués.

Réduction : Bien qu'il n'existe à ce jour pas de méthode de remplacement pour réaliser ces études, notre expérience du modèle nous a permis de définir le nombre d'animaux minimum à utiliser afin d'être statistiquement significatif.

Raffinement : Une grande importance sera accordée au bien-être des animaux. En termes de raffinement, les animaux sont hébergés en groupe avec un milieu enrichi. Leur suivi permet de détecter tout signe de souffrance, de détresse et ainsi la prise immédiate des mesures adéquates grâce à l'application de points limites précis. La notion d'enrichissement du milieu des rongeurs utilisés est familière aux demandeurs.

Cette étude utilise 1600 souris sur 5 ans.

9798 Le projet présenté vise le développement de vecteurs mucolytiques capables de franchir la couche de mucus qui recouvre l'épithélium respiratoire, dans le but de traiter, par thérapie génique, la mucoviscidose, l'asthme ou la bronchopneumopathie chronique obstructive, qui sont des causes majeures de mortalité à travers le monde.

Notre projet prévoit l'évaluation de 9 vecteurs sur une période de 3 ans. Pour cela, des études d'efficacité de transfection et d'innocuité seront menées chez la souris et dans des modèles murins pathologiques, après administration respiratoire de complexes composés d'un vecteur à tester et d'un acide nucléique modèle ou thérapeutique. La souris est une des espèces de rongeurs couramment utilisées pour l'étude des pathologies respiratoires et les essais d'efficacité et d'innocuité des médicaments. L'efficacité des vecteurs sera quantifiée sur des prélèvements biologiques issus des animaux traités. L'innocuité des vecteurs sera évaluée grâce au suivi clinique

des animaux au cours des expériences et à des examens biochimiques et histologiques réalisés sur des prélèvements d'organes. Ce projet nécessitera au maximum 732 animaux.

Respect de la règle des 3 R :

Remplacement : Les vecteurs conçus font l'objet d'essais d'efficacité et de toxicité sur des cellules en culture, mais ils doivent également être évalués dans des modèles animaux, car les modèles in vitro actuellement disponibles ne recréent pas la complexité d'un organisme entier, ni les pathologies que nous souhaitons traiter. De plus, la législation sur le médicament exige le recours à l'expérimentation animale pour évaluer l'efficacité et l'innocuité de tout nouveau médicament avant sa mise sur le marché.

Réduction : Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, seuls les vecteurs ayant présenté, dans des expériences sur cellules, une efficacité au moins égale à celle d'un vecteur de référence, seront évalués in vivo. Chaque vecteur subira une évaluation par étape, afin de ne retenir à l'étape suivante que les meilleurs composés. Les expériences seront réalisées par une seule et même personne expérimentée, suivant des protocoles standardisés, afin de garantir une bonne reproductibilité des expériences permettant de réduire le nombre d'animaux par groupe. Chaque fois que possible, 4 animaux par lot seront utilisés contre 6 en temps normal, et plusieurs vecteurs seront évalués en parallèle.

Raffinement : L'hébergement des animaux se fera par groupe de 4 dans un environnement enrichi, et les individus d'une même cage resteront ensemble tout au long des expérimentations, afin de garantir leur bien-être. Les procédures expérimentales seront mises en œuvre de telle sorte à réduire au maximum le stress, l'inconfort et la souffrance. Les traitements seront réalisés sous anesthésie afin d'immobiliser et de tranquilliser l'animal et de palier une douleur. L'utilisation d'anti-inflammatoires ou d'antalgiques pour remédier à la souffrance n'est pas possible dans notre projet, car elle influencerait les données recherchées. En cas de souffrance, l'animal concerné fera l'objet d'un suivi intensifié. En dernier recours, il sera euthanasié sur la base de points limites bien définis.

9799 Avec plus de 40000 nouveaux cas et 17000 victimes par an, le cancer colorectal (CCR) est la plus fréquente des tumeurs malignes et la deuxième cause de décès par cancer en France. Si la survie relative à 5 ans est de 57 %, le pronostic est étroitement lié au stade auquel le cancer est diagnostiqué. Notamment, elle n'est que de 5 % en cas de cancers métastatiques malgré l'amélioration de la chirurgie, des chimiothérapies et des thérapies ciblées. A ce jour, la chirurgie et des cocktails de chimiothérapies (5-fluorouracile et irinotécan essentiellement) visant uniquement les cellules tumorales en prolifération demeurent la pierre angulaire du traitement des CCR métastatiques. Cependant, l'efficacité de ces traitements est fortement entravée par l'apparition fréquente de la résistance aux médicaments et la récurrence tumorale. La compréhension des mécanismes biologiques impliqués dans la récurrence tumorale a connu un essor important avec la découverte de l'existence des cellules souches cancéreuses (CSC) dans de nombreux cancers, incluant le cancer du côlon. Des données récentes montrent que ces CSC résisteraient aux thérapies conventionnelles et seraient à l'origine de l'apparition de métastases et de la récurrence tumorale.

Dans ce contexte, nous avons récemment identifié une protéine potentiellement impliquée dans la chimiorésistance des CSC. Dans le cadre de ce projet de recherche, nous voulons donc évaluer l'impact de nouvelles molécules ciblant spécifiquement cette voie de signalisation sur le potentiel d'échappement aux chimiothérapies et d'initiation tumorale des cellules souches cancéreuses coliques. Pour mener à bien notre projet, Nous réaliserons des xénogreffes de cellules tumorales humaines en sous-cutanée dans des souris immunodéprimées (250 animaux) afin de déterminer les effets de ces molécules sur la chimiorésistance, la récurrence post-traitement et le potentiel d'initiation tumorale des cellules tumorales coliques.

Afin de respecter les principes des 3Rs (Réduire, Raffiner et Remplacer), nous avons :

i) réduit au minimum le nombre d'animaux requis pour ces expériences originales en fonctions de nos études précédentes. Nous utiliserons des kits et des protocoles permettant de préparer suspension cellulaire, ADN, ARN et protéines à partir du même échantillon afin de réduire encore le nombre d'animaux.

ii) Mis en place une grille d'évaluation de la douleur et des points limites adaptés à l'injection de cellules tumorales en sous-cutanée et l'injection de chimiothérapies afin de minimiser la douleur subie par les animaux et d'identifier les critères d'interruption. Les souris sont élevées selon les recommandations de la directive européenne 2010/63/EU dans des grandes cages et enrichies par un matériel de nidification. Dans nos conditions d'élevage, le phénotype de la lignée utilisée (souris « nude » athymique) est considéré comme non dommageable. Enfin, nous n'effectuerons pas d'expérimentation invasive induisant douleur et stress sur les animaux vivants. Les animaux seront surveillés quotidiennement pour détecter précocement l'apparition éventuelle de douleur ou stress. Ils seront euthanasiés si nous observons l'un des signes définis dans notre grille d'évaluation de la douleur et des points limites.

iii) optimisé les procédures expérimentales afin de réduire l'inconfort subi par les animaux tout en optimisant les informations obtenues, via notamment la mise en place de procédures de remplacement par des modèles *in vitro* afin de confirmer et de renforcer les résultats obtenus. Cependant, les modèles de cultures cellulaires *in vitro* ne peuvent pas se substituer efficacement aux analyses *in vitro* car elles ne prennent pas en compte le rôle du métabolisme et du microenvironnement dans le processus de chimiorésistance et de récurrence. Ces expériences ne peuvent donc pas être réalisées autrement que sur la souris immunodéprimée, sans que cela se traduise par l'obtention de résultats moins fiables.

9800 L'obésité et ses complications représentent un problème de santé publique croissant dans notre société. Les études épidémiologiques et les recherches menées chez l'animal ont identifié l'obésité maternelle, le diabète gestationnel, et l'alimentation maternelle déséquilibrée comme autant de facteurs de risque augmentant la vulnérabilité à l'obésité de la descendance.

Afin de réduire ce risque, une stratégie de prévention consiste à prendre en charge les futures mamans pendant la grossesse. Ainsi des supplémentations orales en folates et en Fer sont recommandées par l'Organisation Mondiale de la Santé pour les femmes enceintes afin de prévenir les anomalies du tube neural, l'anémie maternelle, les petits poids de naissance ou encore les naissances avant terme. Chez la femme, la tolérance et l'innocuité d'une molécule, la molécule M, durant la grossesse ont été démontrées et les études cliniques montrent aussi que la supplémentation en cette molécule chez des patientes présentant un diabète gestationnel non contrôlé améliore l'équilibre glycémique et permet d'éviter l'insulinothérapie. Des études précédemment menées chez le rongeur montrent le bénéfice pour la descendance d'une supplémentation périnatale avec molécule M dans le cadre d'un diabète ou d'un syndrome métabolique gestationnel. Le projet consiste à étudier l'intérêt d'une supplémentation en molécule M administrée aux futures mères pendant la période périnatale afin de réduire la vulnérabilité à l'obésité de la descendance dans un modèle expérimental chez la souris n'induisant pas de troubles métaboliques déclarés (obésité, diabète gestationnels). L'objectif est de déterminer si la supplémentation avec la molécule M peut être indiquée dans le cadre d'une alimentation maternelle déséquilibrée (hypercalorique) sans pathologie déclarée, situation bien trop fréquente chez l'humain. Ainsi ce potentiel rôle protecteur de la molécule M sera évalué chez la souris recevant un régime hypercalorique à partir de l'accouplement. Dans ce modèle de déséquilibre nutritionnel non pathologique, nous testerons si la molécule M administrée aux souris femelles pendant la conception, la gestation et la lactation réduit la prise de poids et améliore le contrôle glycémique de la descendance lorsque celle-ci est placée sous régime hypercalorique à l'âge adulte. Comme cela est le cas pour les supplémentations en folates, nous espérons montrer que la prise de la molécule M peut être indiquée dans un contexte gestationnel non pathologique et que cela apporte un bénéfice réel pour la descendance.

L'étude nécessite l'utilisation de modèles expérimentaux vivants. En effet, il n'existe pas actuellement de méthodes ou de modèles de substitution permettant d'étudier simultanément des paramètres de physiologie intégrée comme la prise alimentaire, la glycémie, le poids, l'adiposité, l'état hormonal etc. En effet, ces paramètres mettent en jeu des dialogues entre organes qui ne sont pas modélisables *in vitro* ou *in silico*. Ainsi le projet sera réalisé chez la souris, modèle de référence pour les études métaboliques précliniques, du fait de nombreuses similarités entre son métabolisme et celui de l'Homme.

Nos études antérieures nous ont permis de valider le modèle expérimental de déséquilibre nutritionnel périnatal qui sera utilisé dans ce projet et de déterminer le nombre d'animaux nécessaires et suffisants pour mener l'étude. Cette étude nécessitera 84 animaux environ (parents et progéniture inclus), répartis en 2 groupes, supplémentés avec la molécule M ou non supplémentés. Un suivi quotidien sera fait pour s'assurer du bien-être des animaux, tandis que les prises de mesures hebdomadaires (poids, prise alimentaire) seront effectuées. L'ensemble des procédures utilisées pour générer le modèle et pour les prises de mesure ont été optimisées et standardisées. De plus, les animaux sont élevés dans un environnement enrichi permettant l'expression de comportements innés et favorisant le soin maternel et la protection des animaux. Ce raffinement contribue au bien-être animal, ce qui réduit la variabilité interindividuelle engendrée par le stress, et par conséquent limite le nombre d'individus nécessaires pour les études statistiques.

9801 La réponse du système immunitaire est contrôlée par les cellules de type macrophage. Une meilleure compréhension des facteurs qui régulent leur activité va permettre de générer des vaccins plus efficaces et éventuellement des nouvelles thérapies contre des maladies comme le cancer. Nous avons découvert chez la souris que l'absence de molécules nommées RANK et RANKL provoque la perte d'un certain type de macrophage. Afin d'étudier comment son absence affecte l'activité du système immunitaire nous allons immuniser des souris avec des virus. Ces virus sont peu offensifs mais sont très immunogènes. Nous allons ensuite étudier la réponse antivirale. Le nombre total des souris est de 400 animaux. Il n'est pas possible de remplacer les animaux par des expériences de culture cellulaire in vitro car actuellement il n'existe pas de méthodologie qui reproduit la complexité cellulaire nécessaire afin d'induire et d'étudier la réponse immunitaire. Nous utiliserons les connaissances rapportées dans la littérature afin de réduire le nombre de souris. L'analyse de nos données sera effectuée par des tests statistiques de type ANOVA/Bonferroni. Les animaux seront hébergés en groupe sociaux dans un environnement enrichi et observés quotidiennement. Nous portons une attention particulière au raffinement des conditions d'hébergement, et nous efforçons de réduire au mieux une éventuelle souffrance des animaux. Les prélèvements et les immunisations seront effectués par un personnel compétent sur les souris sous anesthésie générale gazeuse, en utilisant lorsque cela est nécessaire des dispositifs scientifiques adaptés à la procédure et à l'âge des animaux.

9802 Le méningocoque est une bactérie pathogène de l'homme responsable de septicémies (infections généralisées) et de méningites (infections du système nerveux). Ces infections sont extrêmement graves et malgré les traitements disponibles, elles restent parfois mortelles et leur guérison est souvent associée à des séquelles importantes.

Le pouvoir pathogène du méningocoque réside dans la capacité de la bactérie à coloniser les vaisseaux sanguins. La bactérie, une fois passée dans le sang, peut en effet se fixer sur la paroi des vaisseaux sanguin et s'y développer pour former des colonies bactériennes. Après quelques heures, ce processus abouti à la destruction du vaisseau colonisé.

L'étude des infections à méningocoques est rendue difficile par la spécificité de cette bactérie pour l'homme, celle-ci ne colonisant que les vaisseaux sanguins d'origine humaine. Pour pallier ce problème, notre équipe a développé un modèle animal permettant de reproduire l'infection à méningocoques chez la souris. Ce modèle est basé sur la greffe d'un petit bout de peau humaine sur le dos de souris immunodéficientes. Lors de la prise du greffon, les micro vaisseaux humains contenus dans la peau humaine vont se connecter aux micro vaisseaux murins. Ainsi, si l'on injecte des bactéries à ces animaux, celles-ci vont pouvoir se fixer dans les vaisseaux humains présents dans le greffon et reproduire la situation observée chez l'homme.

Le but de ce projet est d'utiliser ce modèle pour observer sur des temps relativement long (environ 24h), toutes les étapes de la colonisation vasculaire par la bactérie grâce à des techniques d'imagerie récentes. Le bénéfice attendu du projet est une meilleure compréhension des infections à méningocoques, l'amélioration des traitements existant et le développement de nouvelles stratégies préventives.

Pour la réalisation de ce projet, 640 souris seront utilisées sur 5 ans réparties dans 3 procédures expérimentales ayant un degré de sévérité modéré. Ce projet occasionnera quelques contraintes pour les animaux. Ceux-ci devront subir une procédure chirurgicale faiblement invasive pour greffer de la peau humaine sur leur dos avec port d'un bandage pendant 2 semaines pour assurer une bonne prise de la greffe. Le niveau de sévérité attendu est modéré. Les animaux reçoivent un traitement antidouleur pendant 3 jours après la procédure chirurgicale. Pendant les deux semaines du port du bandage, les animaux sont observés quotidiennement afin de vérifier l'absence de signes de douleur ou de gênes occasionnées par le bandage. Lors de l'infection, le niveau de sévérité attendu est léger car les manifestations des conséquences de l'infection ne se produisent que dans la petite section de peau greffée sur le dos de l'animal, donc de manière très localisée et superficielle. Les animaux greffés et infectés seront mis à mort à la fin de l'étude.

Bien qu'une grande part des activités de recherche de notre équipe s'effectue in vitro quand cela est possible, ce projet nécessite le recours à l'animal car c'est le seul moyen d'étudier les conséquences de l'infection par le méningocoque sur de véritables vaisseaux sanguins humains et ceci sans danger pour l'homme.

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 minimum d'animaux nécessaire pour atteindre l'objectif fixé.

Les souris immunodéficientes 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.

9803 La formation réglementaire à la chirurgie expérimentale (pour les chercheurs et pour les techniciens de laboratoire) est agréée par le Ministère de l'Agriculture. Cette formation a comme objectif d'assurer la formation spéciale complémentaire obligatoire à tout personnel réalisant des actes chirurgicaux sur l'animal dans des études utilisant l'animal de laboratoire vivant. La formation est organisée en Mars, Mai et Novembre de chaque année.

Cette formation suit un programme réglementaire validé par la Commission Nationale d'Expérimentation Animale (CNEA) avec des cours (CM), des travaux dirigés (TD) et des travaux pratiques (TP).

Dans le cadre de cette demande, seules les séquences pédagogiques utilisant des animaux seront décrites, à savoir :

Séance de TD d'anesthésie-monitoring utilisant des rats

Séance de TP d'implantation de cathéters utilisant des rats

Séance d'ovariectomie utilisant des rats

En fin de formation, les animaux sont euthanasiés. A chaque fois, nous recherchons, auprès de nos collègues enseignant-chercheurs, si une opportunité se présente pour utiliser leurs cadavres à titre pédagogique (séance de TP d'anatomie ou TP de sutures par exemple).

Le nombre de stagiaires par session de formation est variable d'une session à une autre et se trouve généralement de 14 maximum, ce qui amène à utiliser 24 rats pour un groupe de 14 stagiaires, à chaque formation, soit 360 Rats sur 5 ans, au maximum.

En matière de remplacement, l'utilisation de méthodes alternatives précède la mise en œuvre des techniques chirurgicales sur animaux vivants, par exemple pour la réalisation des sutures. En matière de réduction, le nombre d'animaux utilisés est restreint et l'organisation en groupe de travail est favorisée pour mutualiser (2 stagiaires pour un animal opéré sur certaines séquences par exemple). En matière de raffinement, les protocoles d'anesthésie-analgésie sont adaptés de manière à éviter toute douleur ou souffrance aux animaux. L'objectif de cette formation est d'améliorer la pratique quotidienne des stagiaires afin qu'ils puissent appliquer les principes du raffinement dans leurs expérimentations (meilleur choix des protocoles anesthésiques, meilleur monitoring et meilleure prise en charge post-opératoire par exemple), et ainsi obtenir une meilleure efficacité notamment une meilleure reproductibilité dans les résultats ce qui aboutit à une réduction du nombre d'animaux utilisés pour atteindre les objectifs scientifiques.

9804 Les sarcomes sont un groupe de nombreuses tumeurs cancéreuses rares (2% de tous les cancers) qui se développent à partir de cellules issues du tissu de soutien de l'organisme. Il peut s'agir de tumeurs des "tissus mous" (tissu adipeux, muscles, vaisseaux... mais aussi viscères : estomac, colon, etc.) et des parties "dures" (os et cartilages) du corps. Les sarcomes des tissus mous et des viscères sont les plus fréquents des sarcomes. La classification actuelle des sarcomes leur donne le nom du tissu auquel ils ressemblent. Il existe 8 classes de sarcomes qui sont elles-mêmes divisées en sous-types, pour donner environ 100 sous types de sarcomes différents connus à ce jour. Aucun traitement n'est actuellement disponible contre la plupart des sarcomes et la survie médiane est d'environ 15 mois. Par conséquent, trouver de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le sarcome demeure un défi clinique urgent.

Les xénogreffes dérivées de tumeurs de patients sont les modèles "in vivo" les plus pertinents pour les études anticancéreuses car elles conservent bien la diversité moléculaire des cancers ainsi que leurs caractéristiques histologiques ; de plus ces modèles sont prédictifs des résultats cliniques. Ces xénogreffes sont couramment utilisées pour l'évaluation préclinique des médicaments, l'identification de biomarqueurs et pour les stratégies de médecine personnalisée.

Nous avons récemment commencé une collection de modèles de xénogreffes de sarcomes. Etant donné la rareté des sarcomes, il n'existe à l'heure actuelle que très peu de ces modèles. Notre collection est unique en France. Il existe quelques modèles en Belgique et aux Etats-Unis mais aucune collection exhaustive. En moyenne 60 patients par an sont opérés de sarcome sur notre centre. L'objectif est de greffer un maximum de sarcomes de façon à obtenir une collection variée comprenant de nombreux types de sarcomes. Le but de notre travail est de constituer une collection exhaustive de la majorité des sarcomes que nous pourrions mettre à disposition de la communauté scientifique internationale.

Le plan expérimental a été conçu en prenant en compte la règle des 3R :

- Remplacement : Au sein de ce projet, l'utilisation d'animaux à des fins expérimentales est indispensable. Il n'existe en effet pas d'alternative in vitro permettant de garder les caractéristiques histologiques et moléculaires des tumeurs de patients.

- Réduction : Le nombre d'animaux sera réduit au maximum mais il doit être cependant suffisant afin d'avoir une bonne représentabilité de l'ensemble des tumeurs générées.

- Raffinement : Tout au long du déroulement des expériences, une observation quotidienne de l'état clinique des souris utilisées sera assurée. Les greffes sont réalisées sous anesthésie gazeuse, et donc sans souffrance ni stress pour l'animal. Des antalgiques ou anti-inflammatoires non stéroïdiens pourront être utilisés si nécessaire. Les animaux sont hébergés dans une animalerie agréée où les paramètres physiques sont contrôlés. L'espace de vie de l'animal est enrichi à l'aide de litière mélangée à des copeaux pour la confection de nids, ainsi que de brique de peuplier à grignoter.

Pour l'ensemble du projet nous avons prévu un nombre total de 360 souris par an, soit 1800 souris sur une durée de 5 ans. Ces souris sont immunodéficientes ce qui permet de réaliser des xénogreffes de tumeurs humaines dans un modèle murin sans rejet par le système immunitaire. Elles constituent donc le meilleur modèle pour des études de croissance tumorale à partir de xénogreffes de tumeurs humaines.

9805 Les lots de TUBERTEST (test de diagnostic d'une infection à la tuberculose et d'une réponse immunitaire à la vaccination par le BCG) doivent être contrôlés avant leur mise sur le marché dans le cadre de la procédure de libération européenne et selon les référentiels réglementaires en vigueur. Les protocoles expérimentaux appliqués et les spécifications relatives à la qualité de ces vaccins sont décrits dans les monographies de la Pharmacopée européenne et les rapports techniques de l'OMS. Ces méthodes 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, administration, ...) ce qui permet de réduire le nombre d'animaux utilisés en expérimentation animale pour vérifier l'efficacité de ces produits. Par ailleurs, dans la mesure du possible, nous nous efforçons de regrouper les analyses de produits afin de réduire le nombre de cobayes utilisés. Le contrôle des produits tuberculine (4-6/an) nécessite 48 animaux/an, soit 240 sur 5 ans. Les cobayes sont hébergés dans des cages enrichies de tubes PVC leur servant de

cache. La nourriture et l'eau de boisson sont contrôlés et disponible ad libitum. Des points limites ont été définis en amont des expérimentations. L'efficacité des vaccins dépend de la réponse immunitaire de l'organisme. Cette réponse ne peut être étudiée sur cellules isolées.

La détermination de l'activité de lots de TUBERTEST (test de diagnostic de la tuberculose) est réalisée sur le produit prêt à la mise sur le marché.

9806 Les taxanes et dérivés de platine sont couramment utilisés en chimiothérapie car ces molécules sont très efficaces pour traiter de nombreuses tumeurs solides (sein, ovaire, testicule, prostate, poumon, tête et cou...). Cependant, leurs effets secondaires neurologiques tels que des bourdonnements dans les oreilles, acouphènes, vertiges, engourdissements, hypersensibilités à la douleur conduisent les patients à l'arrêt du traitement. Bien que le mode d'action antitumoral de ces molécules soit largement décrit dans la littérature, l'état de la recherche ne permet pas à l'heure actuelle de comprendre comment sont induites les neuropathies provoquées par ces traitements chez les patients.

L'hypothèse de recherche pour expliquer la survenue de ces effets délétères est que les taxanes et dérivés de platine agissent sur les nocicepteurs et/ou les neurorécepteurs. Ce sont des canaux ioniques et des récepteurs impliqués dans la nociception.

Nous avons mis en place des modèles ex vivo permettant de perturber l'activité de certains de ces nocicepteurs, notamment grâce à des modèles de cultures primaires de ganglions dorsaux de la moelle épinière. La perturbation des nocicepteurs dans ces modèles ex vivo a mis en évidence des modifications de la sensibilité à la douleur, notamment par une activation de l'expression de gènes impliqués dans la douleur. Ce phénomène pourrait donc expliquer les effets secondaires observés chez les patients traités par chimiothérapie.

Grâce à ces nouvelles connaissances validées in vivo, nous avons pu faire le lien avec les neuropathies périphériques et déterminé une molécule qui permet de rétablir l'expression génique de nocicepteurs ex vivo. Dans ce projet constitué de deux procédures, l'objectif est de nous assurer que cette molécule abolit le remodelage des nocicepteurs sans empêcher l'action antitumorale du cisplatine et des taxanes. Nous espérons donc une réduction tumorale et une diminution des effets secondaires. Ces expériences chez la souris constituent une étape essentielle avant de pouvoir lancer une étude clinique sur des patients en collaboration avec un centre anticancéreux.

Nous avons choisi de les faire sur des modèles de souris de fond génétique NUDE. C'est un modèle d'induction des tumeurs déjà bien documenté dans la littérature.

Remplacement : Nos études in vitro ont déjà montré que les dérivés de platine induisent une modification significative de l'expression de certains gènes impliqués dans la nociception. Ces résultats ont été validés in vivo (PEA 363). Nous avons ensuite testé in vitro une molécule non toxique, le N-acétyl-cystéine (NAC), permettant de rétablir l'expression génique des nocicepteurs cibles. Nous devons à présent nous assurer que cette molécule n'interfère pas avec l'action antitumorale du cisplatine et des taxanes. A l'heure actuelle, aucune méthode alternative ne permet de satisfaire l'objectif de Remplacement absolu à notre connaissance. Nous devons donc réaliser des injections intra-péritonéales de taxanes ou cisplatine +/- NAC ou formulations non toxiques (à base de N-acétyl-cystéine) chez la souris développant des tumeurs par xénogreffe (injection sous-cutanée dans le flanc d'une lignée cellulaire humaine non modifiée (cancer du sein).

Réduction : Nous avons réduit le nombre d'animaux au minimum garantissant d'avoir des résultats statistiquement significatifs. Pour cela, nous nous sommes appuyés sur un test statistique G*Power.

Raffinement : le but de notre procédure est de réduire la taille de la tumeur tout en diminuant les effets secondaires de la chimiothérapie. Afin de ne soumettre nos animaux à aucune souffrance inutile, nous avons réfléchi à des points limites clairs, précis et adaptés à notre protocole de développement tumorale. Tout au long de l'étude, nous observerons nos souris en nous appuyant sur des grilles de score. Ces grilles de score nous permettront de sortir les souris de l'étude lorsqu'un point limite sera atteint. Lorsque nous approcherons d'un point limite, nous mettrons en place une surveillance renforcée de nos animaux. De plus, les sites d'injection intrapéritonéale seront alternés droite/gauche et haut/bas au niveau de l'abdomen, afin d'éviter les hématomes. Une solution désinfectante (Dakin) sera appliquée en local pour réduire les risques d'infection et d'inflammation

Nous utiliserons au total 388 souris pour l'ensemble de notre étude.

9807 Les travaux du Laboratoire ont permis de mettre en évidence pour la première fois qu'un extrait de graine de lin (composé en majorité d'oligosaccharides neutres de haute masse moléculaire) stimule la prolifération cellulaire, la migration des fibroblastes et la différenciation des kératinocytes, améliorant la cicatrisation cutanée. Nous souhaitons réaliser une étude de sécurité in vivo. Des études réalisées in vitro n'ont montré aucun effet significatif de l'extrait de lin sur la prolifération, la migration et l'invasion des cellules de mélanome murin B16F1 mais nous souhaitons vérifier in vivo que cet extrait ne favorise pas le développement de mélanome avant de l'utiliser comme agent favorisant la cicatrisation cutanée.

Afin de répondre aux objectifs de ce projet, le recours à l'expérimentation animale est nécessaire car il n'existe pas, à l'heure actuelle, de méthode alternative permettant de modéliser de manière fiable le comportement des cellules cancéreuses dans un organisme entier vivant. Le comportement de ces cellules dépend de très nombreux facteurs et notamment de son environnement direct.

La souris C57Bl6 a été choisie comme modèle car elle est appropriée pour la mise en place d'un modèle de mélanome et son caractère consanguin renforce la probabilité d'une pousse tumorale homogène.

Le stress des animaux sera pris en charge : en respectant une période de stabulation de 7 jours après réception ; en hébergeant les animaux en groupe et en conservant autant que possible les groupes formés afin de maintenir la stabilité hiérarchique établie; et en leur mettant à disposition un enrichissement matériel spécifique à l'espèce utilisée.

Des critères d'interruption ou « points limites » seront définis tout au long de ces études. Des méthodes permettant de prévenir l'apparition de ces points limites seront mises en place.

Un suivi clinique quotidien des animaux sera réalisé afin de détecter tout signe anormal suivant une grille établie lors des expérimentations précédentes et ainsi prendre les mesures nécessaires le plus rapidement possible. Toute anomalie clinique sera rapportée au responsable sanitaire de l'établissement. Des mesures thérapeutiques seront prises pour traiter les animaux en fonction des signes cliniques observés (injection de fluides / analgésiques, isolement, réchauffement, etc.).

Le nombre d'animaux utilisés (80 souris) est limité mais suffisant pour réaliser des tests statistiques sur les résultats obtenus.

9808 Les études menées au sein de notre centre de recherche, suivant les demandes faites par nos clients, devraient nous amener périodiquement à devoir former et à entraîner notre personnel technique à diverses méthodes d'administration de traitements par voie orale ou par injections et à des prélèvements sanguins chez la souris.

Ces formations se feront en interne sous la responsabilité du vétérinaire et du responsable des animaleries du centre.

Ces formations concernent des actes de degré de sévérité léger: prélèvements sanguins à la veine caudale, à la veine saphène latérale ou médiale ou à la veine mandibulaire, administration de traitements (sous forme de solution buvable ou de poudre à mettre en suspension) par gavage, injection sous-cutanée, intra-péritonéale, intramusculaire et intraveineuse (veine caudale) chez la souris, ou de degré de sévérité modéré: injection intraveineuse chez le souriceau anesthésié.

Dans le cadre de ces projets de formation interne pour une durée totale de 5 ans, nous estimons avoir besoin au maximum de 50 souris (BALB/c, C57BL/6 ou swiss Nude) par an, soit 250 souris 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 nécessaire et suffisant à la mise en place de séances de formation adaptées pour une durée de 5 ans au sein de notre animalerie. Un maximum de 50 souris sera nécessaire par an. Aucun test statistique ne sera réalisé dans ce projet étant donné qu'il s'agit ici de formation à des gestes techniques.

- Les formations pour plusieurs techniques seront dans la mesure du possible regroupées afin de limiter le nombre d'animaux utilisés par séance ainsi que le nombre d'anesthésies éventuelles par animal.

2) Raffinement :

Au cours de ce projet, le souci du bien-être animal passera notamment par :

- une période d'acclimatation d'au minimum 5 à 7 jours au sein de l'animalerie avant l'entrée des animaux en "protocole d'entraînement"

- de bonnes conditions d'hébergement (soins, enrichissements du milieu)

- un suivi régulier des animaux (observations biquotidiennes, pesées régulières, analyse du comportement)

- l'instauration de points limites pertinents et précoces

- la mise en place de mesures adaptées (anesthésie, analgésie si nécessaire : injection en sous cutanée de buprénorphine à 0.05 mg/kg ou euthanasie par des méthodes reconnues : paragraphe 3.3.3)

Afin d'améliorer la réactivité du personnel technique animalier, une grille de score de la douleur est mise en place dès que celle-ci s'avère nécessaire afin de pouvoir détecter précocement tout point limite et mettre en place les actions adéquates.

3) Remplacement :

La formation continue du personnel technique nécessite périodiquement de devoir utiliser des animaux pour acquérir ou pour entretenir certaines compétences concernant la réalisation de prélèvements sanguins, les administrations de traitement par gavage et diverses méthodes d'injection (IV, IM, IP). L'acquisition de cette technicité ne peut se faire uniquement de façon théorique et nécessite donc l'utilisation d'animaux, ce qui limite le remplacement. Les formations pour plusieurs techniques seront dans la mesure du possible regroupées afin de limiter le nombre d'animaux utilisés par séance ainsi que le nombre d'anesthésies éventuelles par animal. Toutes les formations sont encadrées par le vétérinaire du centre, par le responsable des animaleries et/ou, éventuellement par le concepteur du/des projet(s) détenteur d'une autorisation d'expérimenter.

9809 Les cancers du colorectaux se placent en France au premier rang en termes de survenue et au deuxième rang en termes de mortalité due aux cancers. Les traitements reposent sur la chirurgie ou les traitements médicamenteux. Malgré des progrès substantiels dans la prise en charge du cancer colorectal métastatique (CCRm), il reste encore environ 40% des patients qui ne répondent pas au traitement. C'est pourquoi l'identification de nouvelles cibles moléculaires accessibles aux anticorps permettrait le développement de nouveaux modèles de thérapie ciblée.

Nous avons identifié la claudine-1 (CLDN1), principale protéine transmembranaire des jonctions serrées, comme cible thérapeutique dans le CCRm. Puis, nous avons montré que CLDN1 est surexprimée et localisée à la membrane des cellules cancéreuses. De plus, l'expression du gène de CLDN1 a une valeur pronostique dans certains sous-types, une faible expression de CLDN1 étant associée avec une survie sans progression plus longue.

Pour cibler CLDN1, un anticorps monoclonal (Acm 6F6) dirigé contre les parties extracellulaires a été produit. Nous avons montré que la liaison de l'Acm 6F6 sur CLDN1 provoque un ralentissement significatif de la croissance, la migration et l'invasion des cellules tumorales aussi bien in vivo qu'in vitro. Ce travail a permis de faire la preuve de concept que le ciblage de la CLDN1 par un Acm avait un effet thérapeutique dans le CCRm. De plus, nous avons identifié une sous-population de patients représentant environ 40% des patients atteints de CCRm, qui pourraient bénéficier d'un traitement anti-CLDN1

Notre objectif maintenant est d'augmenter son efficacité thérapeutique. Nous avons généré un Antibody Drug Conjugated (ADC) et des résultats préliminaires ont montré l'efficacité de ce dernier in vitro, nous encourageant ainsi à le tester in vivo. Ces expérimentations animales nous permettront d'évaluer l'efficacité de l'ADC seul ou en combinaison avec la chimiothérapie. À terme, nous espérons développer un nouveau modèle de thérapie ciblée, enrichir l'arsenal thérapeutique du cancer colorectal et ainsi permettre de proposer de nouvelles alternatives en cas de résistance thérapeutique.

Pour ce projet, 240 à 432 souris pourront être utilisées dans les 5 ans à venir, ce nombre dépendra des résultats des premières expériences pour sélectionner les combinaisons (ADC + chimiothérapie) les plus prometteuses. Le nombre d'animaux choisis pour ces procédures est toujours le nombre minimal nécessaire pour obtenir des résultats fiables et statistiquement significatifs. Nous respectons scrupuleusement la règle des 3R « Raffiner, Réduire, Remplacer ». Nous avons donc optimisé notre procédure expérimentale pour utiliser le moins d'animaux possible en faisant au préalable des expériences in vitro.

Le bien-être des animaux sera pris en compte tout au long de l'étude et des mesures destinées à réduire la contrainte, la douleur et la souffrance des animaux ont été prévues. Comme le contact social entre congénères constitue la meilleure stimulation, l'hébergement par groupe de 4 ou 5 animaux par cage sera effectué. Les animaux seront visités tous les jours, et seront manipulés avec précaution lors des traitements et du changement des cages. Nous fournissons aux animaux du coton ou des petits éléments permettant de se cacher. Tout au long du déroulement des expériences, une observation quotidienne de l'état clinique des souris utilisées sera assurée. Tout animal présentant un signe de souffrance sera soigné ou euthanasié.

A la fin de chaque expérience, les souris seront euthanasiées par insufflation progressive de CO₂.

9810 Malgré les grandes avancées réalisées dans le domaine de la vaccination, des pathologies tels que le SIDA ou le paludisme n'ont pas encore de vaccin prophylactique efficace. Il est de plus en plus clair que les stratégies classiques de vaccination (virus inactivé, atténué ou protéines dérivées du virus) ne sont pas capables d'apporter une protection satisfaisante. La problématique réside dans l'adressage des vaccins à un compartiment du système immunitaire auquel les stratégies classiques ont difficilement accès. De ce fait, le développement de nouvelles stratégies vaccinales est nécessaire. Notre approche consiste à utiliser des vecteurs lentiviraux dérivés du virus HIV-1 modifiés pour être non-réplicatifs et non-pathogéniques, pour générer ces réponses spécifiques. De par ses propriétés intrinsèques uniques, ce vecteur peut interagir avec certains éléments du système immunitaire de manière très efficace, là où d'autres stratégies vaccinales peinent.

Dans ce projet nous voulons optimiser l'induction de ces réponses immunitaires en testant la co-injection de molécules stimulatrices avec nos vecteurs. Ces molécules, déjà été utilisées dans d'autres essais vaccinaux, induisent une forte augmentation du potentiel vaccinal tout en ayant une toxicité nulle aux doses utilisées. La finalité de ce projet sera donc d'obtenir un protocole vaccinal potentialisant l'efficacité de notre vecteur, en favorisant l'induction d'une réponse immunitaire efficace tout en diminuant son coût (si nous pouvons l'utiliser à des doses inférieures) et en limitant le nombre d'injections.

Notre projet implique l'utilisation du modèle murin car la complexité de la réponse immunitaire dans le cadre d'une vaccination ne peut être reproduit in vitro. Cependant, une caractérisation approfondie de ces vecteurs in vitro a déjà été effectuée et une compréhension précise de leur fonctionnement est déjà acquise contre des pathogènes tels que l'encéphalite japonaise, le virus du Nil Occidental ou le paludisme.

Lors de ce projet, 600 souris âgées d'au moins 6 semaines seront utilisées. Grâce aux expériences menées antérieurement, nous avons déterminé la taille limite de nos groupes pour permettre une analyse statistiquement significative tout en évitant la surutilisation d'animaux. Le test statistique utilisé pour valider nos résultats sera un test de comparaison ANOVA. Le projet est constitué d'une unique procédure de sévérité légère couvrant une période de 35 jours qui sera déclinée en 3 expériences. La première permettra de choisir la molécule stimulatrice la plus efficace, la seconde définira sa dose optimale et la troisième aboutira à son intégration dans notre protocole vaccinal. Ce découpage est défini pour limiter au maximum l'utilisation d'animaux tout en évitant la redondance dans les expériences. Durant cette procédure, les animaux ne subiront qu'une seule injection en intramusculaire et un prélèvement de sang avant l'atteinte du point terminal, limitant ainsi l'impact de l'expérimentation sur leur bien-être. A cela, s'ajoutera un suivi régulier des animaux par des opérateurs formés, afin de s'assurer tout au long de la procédure l'absence de souffrances ou de contraintes sur les animaux. Le point terminal est défini à 35 jours, date à laquelle les animaux seront mis à mort suivant la procédure. L'ensemble des données rapportées sur l'utilisation de ces vecteurs et de ces agonistes ne laissent pas présager de signes de souffrance. Cependant, si lors

du suivi régulier nous observons des altérations de leur état de santé, nous mettrons les animaux à mort prématurément afin de limiter leur souffrance. Les protocoles de caractérisation de la réponse immune étant opérés en routine dans notre laboratoire, nous obtiendrons un maximum de données exploitables avec ce minimum de manipulations d'animaux. Afin d'assurer le bien-être des souris, elles seront élevées dans des cages dédiées avec un maximum de 7 individus par cage. Chaque cage assure un environnement mimant leur habitat ancestral et est composée d'un tapis de copeaux et des morceaux de coton leur sont fournis afin qu'elles puissent organiser leur espace de vie. Le renouvellement de l'eau, de la nourriture et le nettoyage de la cage (hebdomadaire) est assuré par des animaliers.

9811 L'asthme allergique est une maladie chronique des voies aériennes touchant plus de 300 millions de personnes dans le monde. Les sujets souffrant d'asthme allergique sont 'sensibilisés' à un ou plusieurs allergènes, c'est-à-dire qu'ils produisent des anticorps dirigés contre ces allergènes. Lors d'une réexposition au même allergène au niveau des voies aériennes, les sujets asthmatiques ont une réaction allergique qui peut être induite par ces anticorps et qui est caractérisée par une gêne respiratoire et une inflammation pulmonaire. L'ensemble de ces manifestations cliniques peut être reproduit chez la souris en réponse à une exposition à un extrait d'acariens, l'un des principaux allergènes responsables d'asthme chez l'homme.

Si l'on sait que les anticorps peuvent être responsables de l'asthme allergique, le rôle des différentes sous-classes d'anticorps n'est pas établi, ni celui des différents récepteurs aux anticorps et des principales cellules exprimant ces récepteurs, notamment des neutrophiles, infiltrés en grande quantité dans les poumons de certains sujets asthmatiques. Ce projet de recherche fondamentale va permettre de définir le rôle des neutrophiles et de certains de leurs produits, ainsi que le rôle des récepteurs aux anticorps dans un modèle murin d'asthme allergique induit par exposition à un extrait d'acarien.

L'espèce utilisée pour ce projet de recherche est la souris de laboratoire. Nous estimons devoir utiliser 1652 souris sur les 5 années que durera ce projet. Ce nombre inclut le nombre minimum nécessaire de contrôles et la nécessité de reproduire les résultats. Le calcul du nombre minimal d'animaux par groupe a été fait sur la base de notre expérience antérieure avec ce modèle d'asthme et des tests statistiques que nous avons effectués lors de cette étude antérieure.

Se déployant dans des tissus distincts dont les fonctions, la structure et la vascularisation sont uniques, les pathologies et les thérapies objets d'investigations, ne peuvent pas être remplacées par des modèles *in vitro* : nos procédures expérimentales ont un caractère de stricte nécessité et ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants et susceptibles d'apporter le même niveau d'information biologiquement pertinente.

Il a été établi que de nombreuses propriétés des populations de biomolécules et de cellules du système immunitaire inné et du système immunitaire adaptatif sont conservées entre la souris et l'homme. En conséquence, les résultats expérimentaux sont le plus fréquemment transférables aux humains. De plus, il existe un grand nombre de lignées de souris mutantes, knockout et transgéniques, qui permettent des études mécanistiques approfondies.

Ce projet comporte deux procédures de classe modérée. En effet, l'exposition à des extraits d'acariens chez la souris induit une réponse allergique avec une inflammation locale au niveau des poumons et des voies aériennes. Ces protocoles ne semblent pas induire de douleur aux animaux, au sens de l'absence de critères visibles de douleur/souffrance (comportement social, attitude corporelle, propreté de l'animal). Bien que nous n'anticipons pas d'apparition de signes de douleur dans ce modèle d'asthme aux vues des publications dans le domaine avec ce modèle, tout animal présentant une douleur évidente (isolement, baisse importante de l'activité, perte de poids > 20%, pilo-érection et/ou grimace) sera immédiatement mis à mort par exposition à une concentration croissante en CO₂.

9812 Le but de ce projet est d'identifier la contribution de la composante inflammatoire dans la physiopathologie de l'infarctus du myocarde. La compréhension des différentes phases inflammatoires durant l'infarctus du myocarde au niveau moléculaire ainsi qu'au niveau de l'organe

pourrait conduire à trouver de nouvelles cibles thérapeutiques pour réduire les lésions faisant suite à l'infarctus du myocarde.

Différentes phases inflammatoires durant l'infarctus du myocarde sont bien décrites comme le recrutement de leucocytes ou de macrophages dans la zone infarctée. Cependant, la cinétique et l'organisation spatiale de ces recrutements ne sont pas décrites au niveau du cœur entier. Nous voulons développer une méthode de clarification du cœur, qui consiste à délipider l'organe afin de le rendre transparent tout en conservant les structures moléculaires d'intérêt. L'avantage de cette méthode est de pouvoir imager ensuite le cœur en 3 dimensions, rendu possible par cette étape de clarification. L'imagerie nous donnera accès aux informations concernant la séquence inflammatoire lors de l'ischémie-reperfusion.

En premier lieu, et en fonction des différents groupes d'intérêt de l'étude, une séquence d'ischémie-reperfusion in vivo sera réalisée. La ligature de l'artère principale du cœur (coronaire) implique une chirurgie lourde, sous anesthésie générale. Il s'agit cependant du modèle de référence pour l'étude in vivo et préclinique de l'infarctus du myocarde. De plus, cet acte chirurgical précis est parfaitement maîtrisé par les chirurgiens du laboratoire et fait l'objet d'une analgésie (générale et locale) et d'un suivi post-opératoire parfaitement adaptés. La chirurgie consiste à placer l'animal sous respirateur, puis une thoracotomie est réalisée afin de pouvoir ligaturer l'artère et donc de réaliser la séquence d'ischémie puis de reperfusion en permettant le retour du flux sanguin par le retrait de la ligature. Après suture des plaies, l'animal est réveillé pour une durée pouvant aller jusqu'à 7 jours selon le groupe d'étude.

Le prélèvement terminal du cœur, après mise à mort de l'animal, permettra de réaliser des immunomarquages et de l'imagerie en 3 dimensions sur cœur entier ainsi que des tests biochimiques.

Prise en compte des 3R :

Afin de mener à bien ces investigations qui prennent en considération l'organe entier dans son environnement (inflammation), l'expérimentation animale est nécessaire. (Remplacement)

La phase de mise au point de l'Immunohistochimie sera menée de sorte que, dans la mesure du possible, les animaux de cette phase (20 maximum au total) puissent être intégrés directement aux analyses de la phase 2. Par ailleurs, une étude statistique a été réalisée afin de déterminer le plus précisément possible le nombre minimal d'animaux permettant d'obtenir des résultats statistiquement exploitables. Ainsi, le nombre total d'animaux de l'étude s'élève à 193 souris sur 3 ans. (Réduction)

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

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

9813 L'objectif du projet est d'évaluer les liens entre deux critères d'évaluation de l'efficacité alimentaire individuelle chez le bar (*Dicentrarchus labrax*). L'efficacité alimentaire représente la capacité pour le poisson de convertir son alimentation en gain de poids, et se mesure par le rapport (gain de poids) / (aliment ingéré). Améliorer l'efficacité alimentaire permettrait de réduire l'empreinte écologique des élevages (moins d'aliments consommés, moins de déchets produits). Aujourd'hui, on ne sait pas évaluer de façon pratique l'efficacité alimentaire individuelle des poissons, car ils sont élevés en groupes et il n'est pas possible de connaître avec précision la quantité d'aliment ingérée par chaque individu. Pour pouvoir conduire une sélection génétique en vue d'améliorer l'efficacité

alimentaire, il est crucial de pouvoir avoir des méthodes d'évaluation individuelles, et/ou des caractères corrélés fortement à l'efficacité alimentaire individuelle. Un projet précédent nous ayant permis d'évaluer l'efficacité alimentaire individuelle de 600 poissons élevés en aquariums individuels, nous souhaitons dans ce projet réutiliser ces 600 poissons afin de corréliser leur efficacité alimentaire avec la perte de poids en condition de jeûne, dont des études précédentes suggèrent qu'elle pourrait être un prédicteur efficace et simple à mesurer de l'efficacité alimentaire. L'analyse des données se fera au niveau phénotypique (corrélations) et au niveau génomique. Les poissons utilisés ayant déjà été mesurés pour leur efficacité alimentaire individuelle, et étant caractérisés pour 3000 marqueurs SNP (polymorphismes mono nucléotidiques), seule la mesure de perte au jeûne reste à faire. Conduire le projet sur ces poissons permettrait donc d'éviter d'avoir à rebâtir un nouveau projet pour valider cette corrélation essentielle. Un nouveau projet nécessiterait de refaire une mesure d'efficacité en aquarium individuel pour la corréliser à la perte de poids au jeûne (et l'éviter correspond donc à une Réduction). La validation d'un critère indirect facilement mesurable (perte de poids au jeûne, objet du présent projet), pourrait permettre une sélection pour l'efficacité alimentaire plus efficace et moins traumatisante pour les animaux que la mesure en aquarium individuel (Raffinement). Par ailleurs, pour réduire la souffrance et l'angoisse, les animaux sont manipulés uniquement sur anesthésie pour toutes les mesures individuelles (Raffinement). Ce projet ne peut être conduit que sur des animaux et n'a pas de composante de Remplacement.

9814 La peau constitue la première barrière d'un organisme contre son environnement extérieur. Elle empêche l'invasion d'organismes pathogènes, de la déshydratation ou des rayons UV. Elle est donc constamment sujet à des dommages potentiels, et la réparation des blessures cutanées et donc un processus crucial pour la survie des organismes supérieurs.

Au début de la gestation, les tissus fœtaux blessés peuvent être complètement recréés sans aucune fibrose au cours d'un processus ressemblant à la régénération. Néanmoins chez un mammifère adulte, bien que la lésion soit guérie, la structure des tissus cutanés n'est pas complètement régénérée. Les follicules pileux et les glandes subcutanées ne sont plus présents après réparation des lésions chez la plupart des mammifères adultes, humains inclus. Ainsi la capacité de restaurer les tissus cutanés à leur état d'origine est très appréciée.

Notre but est d'identifier les mécanismes potentiels qui permettent d'améliorer le processus de guérison des blessures et de la régénération cutanée. Nous souhaitons utiliser une souche murine génétiquement modifiée exprimant les gènes requis pour générer des cellules souches pluripotentes induites (iPSCs) in vivo (modèle murin reprogrammable). Ce projet pourrait être potentiellement bénéfiques pour les grands brûlés ou les patients amputés.

La guérison de lésion est un processus complexe qui requiert les efforts de différents tissus, y compris le système immunitaire. Ainsi pour modéliser précisément les dynamiques de cicatrisation et les capacités de régénération de la peau, les expériences requièrent d'être réalisées in vivo. La souris est un modèle régulièrement utilisé pour l'étude de la réparation des lésions cutanées car il présente l'avantage d'avoir une organisation similaire à celle de l'être humain. Des atteintes avec l'âge des performances physiologiques et mnésiques chez la souris sont désormais bien documentées. 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 cicatrisation chez les individus âgés. Enfin, il existe de nombreux modèles de souris génétiquement modifiées mimant les altérations existantes dans les pathologies humaines, notamment dans le domaine de la cicatrisation. D'autre part, la stabulation en animalerie est aujourd'hui bien maîtrisée ce qui est moins le cas chez les autres vertébrés.

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 anesthésiant et un analgésique appropriés pour éviter que les animaux souffrent. Dans les expériences prévues, les droits des animaux seront respectés en tenant compte des contrôles stricts sur l'expérimentation animale appliqués par les Autorités compétentes. Si les animaux impliqués dans les expériences venaient à souffrir, ils seraient mis à mort par exposition au CO₂ et les échantillons collectés pour analyse histopathologique. Le projet comporte 1 procédure de sévérité légère.

La cicatrisation cutanée est retardée chez les individus vieillissants. Ainsi nous prévoyons de tester si l'expression de nos gènes candidats pourrait améliorer la guérison, et améliorer la régénération

tissulaire dans les deux groupes d'âges différents formés de mâles et de femelles. Nous utiliserons quatre animaux par groupe et par expérience, qui est selon notre expérience et les résultats publiés, le nombre minimum requis afin d'obtenir des résultats statistiquement significatifs. Nous répéterons les expériences une fois afin de confirmer nos observations. Nous utiliserons donc 64 souris pour ces tests. La réalisation des quatre blessures à différents moments sur le même animal nous permet de réduire le nombre d'animaux nécessaires pour analyser l'effet des gènes d'intérêt durant les différentes phases de cicatrisation.

9815 Ce projet de recherche translationnelle dont la durée maximale sera de cinq ans vise à étudier l'efficacité d'une nouvelle approche thérapeutique dans le traitement de l'ostéosarcome. L'ostéosarcome est un cancer rare et très agressif qui se développe sur l'os et métastase au niveau des poumons. La prise en charge des patients comprend de la chimiothérapie et la résection totale de la tumeur mais n'empêche pas les rechutes. Il est donc nécessaire de trouver de nouvelles alternatives thérapeutiques afin d'aider les médecins à soigner au mieux leurs patients. C'est pourquoi nous proposons de tester une nouvelle approche thérapeutique (le Dimate) qui empêche la détoxification de la cellule et induit sa mort pour l'ostéosarcome. Différentes études in vitro ont été réalisées avec ce composé. Elles ont permis de montrer un effet antiprolifératif de cet agent sur différentes lignées de cellules cancéreuses cultivées en 2 dimensions ou sous forme de sphères (modélisation se rapprochant un peu plus de la réalité clinique).

Ces études très informatives ont permis de montrer l'intérêt du Dimate pour le traitement de l'ostéosarcome. Avant de pouvoir proposer ce traitement chez l'homme, et de construire des essais cliniques, il est nécessaire de procéder à des tests d'efficacité anti-tumorale qui ne peuvent être menés que dans des modèles intégrant toute la complexité des interactions entre la tumeur et son environnement, c'est à dire dans un modèle animal.

Dans le projet présenté, nous allons tester l'efficacité du Dimate et la comparer à un traitement de référence dans un modèle d'ostéosarcome de rat qui reproduit autant que possible l'évolution clinique de la maladie. Ce modèle est obtenu par greffe d'un fragment tumoral au niveau du tibia de l'animal, pour reproduire au mieux la pathologie humaine.

Règle des 3 R et nombre d'animaux

Avant de tester l'efficacité anti tumorale du composé, nous réactiverons le modèle tumoral à l'aide d'une tumeur congelée sur 6 animaux ; les tumeurs ainsi obtenues permettront de greffer les rats des différents groupes de traitement. Nous procédons de cette manière pour optimiser la prise de greffe qui passe de 60% à 90% selon que les greffons sont issus de tumeur congelée ou d'un animal donneur.

Nous utiliserons le nombre de rats minimum afin d'obtenir des résultats qui nous permettront de prouver avec certitude l'effet anti tumoral des thérapies. Pour cela, comme la dose optimale du nouveau traitement et du traitement de référence est connue chez le rat, nous pouvons directement comparer l'action anti tumorale du nouveau composé à celle de la chimiothérapie. Cette comparaison sera faite sur 36 animaux répartis en 4 groupes de traitements. En cas de résultat positif, cette étude d'efficacité sera reproduite afin de confirmer l'effet observé. Le nombre total serait donc de 42 rats si le dimate n'est pas efficace et de 84 rats s'il l'est.

Afin de réduire au maximum la douleur induite à l'animal au cours de la greffe tumorale, un antidouleur sera administré à l'animal avant la chirurgie réalisée sous anesthésie générale. Les traitements seront administrés trois fois par semaine à des rats porteurs de tumeurs sur une durée maximale de 4 semaines. Durant cette phase de traitement, nous suivrons l'évolution des tumeurs et pourrons ainsi voir si le nouveau traitement (inhibiteur de détoxification) est plus efficace que la chimiothérapie de référence pour ralentir la progression tumorale. Tout au long de cette phase de traitement, un suivi clinique régulier sera réalisé afin de s'assurer du bon état général des animaux. Les effets néfastes attendus sont une croissance tumorale trop importante avec une nécrose tumorale et une perte de mobilité de la patte. Cependant, les points de mesure prévus dans le projet sont suffisamment précoces pour que ce risque soit faible. Ce projet est donc classé modéré.

Un raffinement continu des pratiques d'expérimentation sera pratiqué, les rats seront hébergés en groupes sociaux dans des cages enrichies d'objets à grignoter et de cachettes.

A l'issue de la phase de traitement, tous les animaux seront euthanasiés (que le point limite soit atteint ou non) afin d'analyser la réponse tumorale au traitement.

Nous escomptons pouvoir valider une nouvelle approche thérapeutique pour le traitement des ostéosarcomes métastatiques et/ou en rechute grâce à ce projet. La mise à disposition d'un modèle préclinique permettant de tester de nouvelles approches thérapeutiques dans des conditions se rapprochant le plus possible de l'évolution clinique est un apport précieux. Les observations conduites dans notre modèle représentent un atout majeur pour la conception d'un dossier de demande d'autorisation d'essai clinique auprès des autorités réglementaires. Notre projet est donc véritablement dédié au transfert rapide de données précliniques vers le lit du patient.

9816 Dans le cas d'une lésion cérébrale importante, suite à un accident de la route, sportif ou Accident Vasculaire Cérébral (AVC) grave par exemple, la partie du cerveau endommagée devient inopérante et la vie du patient est sévèrement impactée. Les stratégies visant à réparer le cerveau via traitement pharmacologique ou rééducation ne fonctionnent pas bien, principalement parce que la repousse neuronale est par nature compliquée dans le système nerveux central. Durant ce projet notre objectif sera de tester dans le cortex de rat un dispositif implantable biodégradable alliant guidage et stimulations de pousse afin de faciliter la repousse axonale et soigner le cerveau suite à une lésion d'une partie du cortex moteur. Ce traitement est envisageable chez l'homme suite à une opération de neurochirurgie pour nettoyer la zone traumatisée. Ainsi notre pansement intelligent combinerait guidage, stimulation lumineuse et traitement pharmacologique afin de permettre aux neurones autour de la zone endommagée de se développer et de se reconnecter.

Nous avons déterminé *in vitro* sur des neurones de rats en culture primaire les paramètres optimaux des différentes caractéristiques du pansement. Le présent projet propose la mise au point du dispositif *in vivo*. Nous proposons de le tester sur le rat qui aura subi une lésion dans le cortex moteur (partie qui contrôle les pattes avant). Le pansement sera implanté à l'endroit-même de la lésion. L'effet de celui-ci sera évalué par la récupération motrice de l'animal via des tâches comportementales parfaitement maîtrisées au laboratoire pendant plusieurs mois suivant l'opération.

Le rat apparaît comme le modèle de choix pour ce projet compte-tenu de la similarité de l'organisation de son cerveau avec celle de l'homme. Le nombre total d'animaux prévu pour cette étude est de 100. Ce nombre a été déterminé de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en gardant un nombre suffisant afin de ne pas compromettre la validité des expériences qui seront menées (principe de réduction). L'étude prévoit 3 procédures (chirurgie puis observation par Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) et comportement moteur) appliquées sur 2 cohortes de 2 âges différents : la première de 8 semaines, âge standard dans ce genre d'étude du fait de la plasticité cérébrale des jeunes rats - et 36 semaines, âge pertinent dans l'éventualité du transfert chez l'homme où les sujets sont parfois âgés, notamment dans le cas d'AVCs.

Ce projet implique de la neurochirurgie correspondant à un niveau de douleur de classe modérée, des observations par IRM et quelques tâches comportementales simples correspondant à un niveau de douleur de classe légère. La chirurgie sera effectuée sous anesthésie générale avec une prise en charge antalgique adéquate. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'acte chirurgical ainsi que durant toute la durée des tâches comportementales qui suivront. Il sera évalué à l'aide d'une grille codifiant le niveau de bien-être. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée en cas de signes de souffrance (principe de raffinement).

Le projet ayant pour objectif de fournir une réponse thérapeutique à un accident cérébral, il nous est impossible de remplacer l'animal vivant par un modèle cellulaire ou de simulation informatique (principe de remplacement).

9817 Afin de pouvoir localiser, identifier ou purifier des protéines synthétisées au sein des cellules d'un tissu ou d'un organe, de nombreuses techniques biochimiques utilisent les propriétés des anticorps et à l'heure actuelle rien ne peut se substituer aux caractéristiques spécifiques des anticorps (reconnaissance spécifique, affinité, reconnaissance d'un seul épitope par anticorps monoclonal et de plusieurs épitopes par les anticorps polyclonaux, petite taille : nanobody, Fab, purification aisée sur protéine A, L, G...). Les anticorps sont des molécules sécrétées dans le sang par des cellules

du système immunitaire (plasmocytes B) en réaction à la reconnaissance de substances étrangères à l'organisme. Les anticorps s'obtiennent en injectant à un animal la protéine d'intérêt en présence d'adjuvant ce qui produit une sensibilisation du système immunitaire mais peu d'anticorps sont produits. Pour augmenter la production d'anticorps il est nécessaire de faire des rappels (comme lors d'une vaccination) c'est-à-dire de nouvelles injections de la protéine d'intérêt. Après 4 rappels, les anticorps sont récupérés dans le sérum de l'animal (exsudat du sang coagulé). Pour cela l'animal est anesthésié et le sang est récupéré après décapitation.

Dans le contexte de notre recherche, nos protéines d'intérêt régulent la polarité des cellules épithéliales et sont très conservées (semblables) parmi les espèces animales. Cette importante similitude rend difficile l'obtention d'anticorps spécifique pour une espèce et explique l'absence dans le commerce de ces anticorps. Nous envisageons de développer des stratégies spécifiques pour en obtenir et pour les caractériser. Nous avons choisi comme animal le rat car les anticorps contre des protéines référentes sont généralement produits par immunisation de lapins ce qui nous permettra d'utiliser nos anticorps murins avec des anticorps commerciaux de lapin pour des co-localisations, par exemple. De plus nous pouvons obtenir environ 10 ml de sang (soit 5ml de sérum) par rat, nous pensons immuniser 2 rats par protéine, la quantité de sérum sera suffisante pour notre étude. Et enfin les cellules de rat sont compatibles avec l'obtention d'anticorps monoclonaux ce qui nous permet d'isoler la cellule productrice de l'anticorps, de l'immortaliser et ainsi produire cet anticorps sans de nouveau immuniser d'animal.

Le projet prend en compte la règle éthique des 3Rs :

- Remplacer : Il n'existe malheureusement pas d'alternative aux anticorps. Toutefois nous aurons la possibilité en immunisant des rats de prélever la rate, d'en isoler les plasmocytes B sécrétant les anticorps de les fusionner à des cellules immortalisées, ces hybridomes seront congelés dans un premier temps. Ils seront décongelés après purification et validation des anticorps polyclonaux du sang des rats pour évaluer la « valeur » scientifique de produire des anticorps monoclonaux. Après culture et sélection de ces hybridomes nous pourrions isoler les cellules qui sécrètent l'anticorps spécifique et ainsi obtenir des anticorps monoclonaux pour les protéines d'intérêt rares. L'obtention d'anticorps monoclonaux a un coût important en temps et en financement c'est pour cette raison que cela ne peut pas être envisagé en routine. Toutefois une fois obtenus, les anticorps peuvent être produits à l'infini sans de nouveau immuniser d'animal.

- Réduction : Le nombre d'animaux (2 rats par protéine immunisée) est adapté au plus juste par rapport à la faible quantité d'antigène que nous avons et pour permettre d'obtenir suffisamment de sérum pour nos investigations et recherches.

- Raffiner : L'environnement des rats est enrichi pour améliorer leur bien-être. Le protocole expérimental préconise l'anesthésie des animaux pour limiter la douleur induite par un seul prélèvement de sang (100mL) après coupure de 2mm de queue puis cautérisation. La récupération du sang se fait post-mortem et la décapitation sous anesthésie pour éviter le stress.

Nous n'envisageons l'obtention d'anticorps que pour un nombre très limité de protéines c'est-à-dire un maximum de 3 à 4 protéines par an sur 3 ans. Un maximum de 8 rats sera immunisé par an soit 24 rats sur 3 ans.

9818 De nos jours il est observé une recrudescence du nombre d'infections dues à des bactéries multirésistantes. Faute d'antibiotiques efficaces face aux plus résistantes de ces bactéries, les médecins se retrouvent obligés de se tourner vers de vieilles molécules tombées en désuétude, et lorsque ces vieilles molécules ne suffisent pas à traiter l'infection, les médecins n'ont d'autre choix que d'associer de façon empirique plusieurs antibiotiques. Cette situation est très préoccupante dans la mesure où les laboratoires pharmaceutiques se sont largement désengagés de ce domaine de recherche, peu rentable, et que très peu de nouvelles molécules antibactériennes sont en cours de développement. Ainsi le contrôle de la résistance bactérienne aux antibiotiques est devenu un enjeu de Santé Publique majeur, les antibiotiques étant des molécules extrêmement précieuses. Dans notre projet, nous avons dans un premier temps testé in vitro l'efficacité de nombreux antibiotiques soit administrés seuls, soit en combinaison sur différentes souches d'*Acinetobacter baumannii* (bactéries Gram-négatif) ayant différents spectres de résistance aux antibiotiques. Trois

médicaments ayant une efficacité prononcée sur la bactérie, notamment en combinaison ont été identifiés : La polymyxine B, la minocycline et la rifampicine.

La polymyxine B est un antibiotique mis sur le marché à la fin des années 1950. Cette molécule a été abandonnée à la fin des années 60 en raison de la commercialisation d'antibiotiques plus facilement maniables et moins toxiques. Toutefois, depuis le milieu des années 2000 et la recrudescence des résistances vis-à-vis des antibiotiques existants, la polymyxine B est revenue sur le devant de la scène comme étant la dernière ligne de défense dans le traitement des infections pulmonaires à bactéries Gram-négatif multirésistantes.

La minocycline est un antibiotique de la famille des tétracyclines commercialisé dans les années 1960 sous forme orale et intraveineuse approuvé par la Food and Drug Administration dans le traitement des infections à *Acinetobacter baumannii*.

La rifampicine est un antibiotique de la famille des rifamycines commercialisé à la fin des années 1960 qui a d'abord montré son efficacité dans le traitement d'infections dues à des mycobactéries telles que la tuberculose et la lèpre. Des travaux récents ont montré l'utilité d'associer la rifampicine à d'autres antibiotiques tels que la colistine ou la polymyxine B dans le traitement d'infections dans des modèles in vivo.

Il nous faut maintenant confirmer l'efficacité observée in vitro sur des modèles animaux, les objectifs de ce projet sont donc de réaliser une étude pharmacocinétique (PK) (devenir des médicaments dans l'organisme) à différentes doses des trois antibiotiques chez la souris infectée puis de réaliser une étude d'efficacité in vivo de ces antibiotiques administrés seuls et en combinaison chez la souris infectée, ceci afin étant d'identifier les meilleures combinaisons et schémas posologiques à tester ultérieurement chez l'homme. Le modèle d'infection utilisé dans ce projet est un modèle d'infection de la cuisse à *Acinetobacter baumannii* chez la souris neutropénique. 1140 souris vont être utilisées pour ce projet. La règle des 3R a été prise en compte dans l'élaboration de ce protocole. Le nombre d'animaux a été réduit au minimum dans les groupes afin de détecter des différences significatives entre les différents traitements testés. Notamment, le nombre de souches utilisé lors des différentes étapes de ce projet varie. Une seule souche est utilisée pour la pharmacocinétique, considérant que le risque de différences pharmacocinétiques entre les souches est mineur. De plus le nombre de souches entre les études d'efficacité des antibiotiques administrés seuls et les études d'efficacité des antibiotiques administrés en combinaison a été réduit de 5 à 3, la première étape ayant permis de sélectionner les souches les plus pertinentes. Tous ces aménagements contribuent à limiter le nombre total d'animaux utilisés dans ce projet. Le remplacement des animaux est impossible car les tests d'efficacité in vitro ont été réalisées et l'étape suivante dans l'optimisation de l'utilisation des antibiotiques en combinaison est une étude in vivo chez l'animal car aucun modèle in vitro ne permet de prendre en compte l'ensemble des paramètres déterminant l'efficacité clinique et la tolérance d'un antibiotique seuls et ou en association. Pendant l'expérimentation, le raffinement est pris en compte, après l'immunosuppression et l'infection, les animaux vigiles sont placés dans un environnement thermostaté, avec libre accès à la nourriture et à l'eau et luminosité contrôlée et alternance veille/sommeil. Les conditions d'asepsie lors de l'administration de l'inoculum et des traitements seront préservées et les souris seront surveillées régulièrement (2 fois par jour) pendant toute la durée de l'expérimentation.

9819 Le paludisme est une maladie parasitaire qui cause environ 2 millions de décès chaque année, en particulier les enfants. Les différentes espèces de *Plasmodium*, le parasite responsable du paludisme, sont transmises à l'homme par des piqûres de moustiques. Après les piqûres, le parasite infecte le foie où il se multiplie, puis infecte les globules rouges (GR). C'est l'infection des GR qui est responsable des symptômes du paludisme, y compris la fièvre et le paludisme cérébral. Face aux parasites, les traitements actuels sont incapables d'éradiquer la maladie avec une résistance toujours plus importante aux antipaludiques. Dans ce contexte, la recherche d'un vaccin contre le paludisme est extrêmement active. Cependant, et alors que les premiers vaccins ont donné des résultats encourageants, la couverture reste insuffisante et le développement d'un vaccin efficace reste plus que jamais d'actualité.

Des problèmes tels qu'un cycle de vie parasitaire complexe et une compréhension incomplète des mécanismes d'une immunité protectrice ont empêché le développement d'un vaccin hautement efficace contre le paludisme.

Parce que ces questions requièrent l'étude in vivo des interactions entre hôte humain et parasites, de nombreuses études ont abordés ces questions dans des modèles murins de l'infection. Cependant, les divergences entre parasites humains et murins impactent les recherches actuelles et le développement de nouvelles stratégies de lutte contre le paludisme.

Afin de pallier ces limites et permettre d'étudier in vivo ces interactions entre parasite et système immunitaire humain, nous proposons de mettre au point un nouveau modèle animal contenant les organes cibles humains des différents stades des parasites (foie, GR) et un système immunitaire humains. Pour cela, des souris dépourvues de système immunitaire et donc incapables de rejeter les cellules humaines greffées seront greffées par des cellules précurseurs hématopoïétiques et par des hépatocytes humains. Deux nouvelles mutations non délétères pour les animaux ont été introduites par croisement dans les souris receveuses établies précédemment au laboratoire. La première permet de réduire l'irradiation des souris receveuses avant la greffe des cellules humaines (communément utilisée dans ces modèles). La deuxième vise à s'affranchir d'un traitement plus ou moins long par injection de liposomes de clodronate, une drogue induisant l'élimination des macrophages de la souris responsables du rejet de certaines cellules humaines. L'efficacité de cette mutation sera comparée à un traitement par les liposomes et le cas échéant, permettra de ne pas utiliser le traitement. Par ailleurs, les mutations délétères habituellement utilisées pour la greffe de cellules de foie humaines seront remplacées par un traitement par des anticorps sans effets douloureux sur les animaux. Enfin, l'emploi de tests statistiques adéquats ont permis une conception optimale des procédures et la réduction du nombre d'animaux sans impacter la qualité des résultats. En résumé, ces mutations et le traitement anticorps auront pour effet de diminuer l'inconfort voire la souffrance des animaux et d'augmenter la qualité de la reconstitution des animaux par les cellules greffées et donc de diminuer leur nombre au sein de chaque procédure. Ajoutés au traitement statistique des résultats, l'ensemble de ces mesures visent à satisfaire à la règle des 3R.

Ces souris humanisées seront ensuite infectées par des parasites humains sauvages ou génétiquement modifiés. Des études précédentes utilisant d'autres modèles de souris humanisées et infectés par des parasites humains ont montré l'absence de signes cliniques chez l'animal, probablement du fait de l'absence d'expression chez la souris des molécules humaines responsables de l'adhérence des globules infectés aux vaisseaux sanguins. Les animaux utilisés seront surveillés quotidiennement pour détecter les des signes de souffrance (apparence du poil, mobilité, prostration...). Pour mieux objectiver la lecture de ces signes, ils seront rapportés sur une grille qui permettra de calculer un score. Selon la valeur de ce score indiquant une souffrance animale limite, les animaux seront mis à mort, de telle sorte qu'aucune des 5 procédures décrites dans la demande ne sera de gravité sévère mais de classe modérée. Les conditions d'hébergement respecteront le bien-être animal. Dans ce projet, 3751 souris, mâles et femelles, nouveau-nés et adultes, seront utilisés sur une période de 5 ans.

En conclusion, l'établissement et la validation du modèle de souris humanisées de l'infection à Plasmodium devraient aider à mieux comprendre l'immunité anti-paludisme et à disséquer la biologie du parasite. Si le but final est de concevoir de nouvelles approches vaccinales et de nouveaux médicaments antiparasitaires pour l'homme, ce projet veillera à respecter l'éthique de l'expérimentation animale.

9820 Chez l'Homme, 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. Elle est produite à partir d'une molécule simple, un acide aminé, la tyrosine qui est d'abord transformée dans le cerveau en L-DOPA puis en dopamine. La conversion de L-DOPA en dopamine se fait grâce à une enzyme appelée décarboxylase des acides aminés aromatiques (AADC). Le seul moyen actuel de soigner la maladie de Parkinson n'est pas curatif, il consiste à donner aux malades de la L-DOPA pour compenser l'absence de dopamine. Cela permet de traiter efficacement pendant un certain temps les symptômes moteurs de la maladie.

Malheureusement, ce traitement chronique finit par provoquer l'apparition de complications motrices sévères sous forme de mouvements involontaires anormaux appelés dyskinésies qui contrecarrent le gain procuré par la L-DOPA et diminuent beaucoup la qualité de vie des patients. De nouvelles voies thérapeutiques sont donc activement recherchées. Une de ces voies est de travailler sur l'hypothèse que plusieurs données suggèrent : la L-DOPA pourrait être un neurotransmetteur et aurait des effets indépendants de sa conversion en dopamine.

Pour tester cette hypothèse, nous proposons dans ce projet d'utiliser différentes approches pharmacologiques pour étudier les caractéristiques de la libération et de la recapture de L-DOPA par les neurones dopaminergiques. Des techniques d'ampérométrie continue (permettant de mesurer la L-DOPA et la dopamine) et d'électrophysiologie (pour enregistrer l'activité des neurones) seront utilisées chez la souris anesthésiée.

Ce projet utilisera 144 souris 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 au maximum le nombre d'animaux en planifiant des expériences qui nous semblent absolument nécessaires pour répondre aux objectifs scientifiques. (iii) Nous mettons en place des tests statistiques performants : ANOVA multi factorielle (traitements pharmacologiques) suivi de tests "post-hoc" de comparaison de moyennes de deux échantillons avec ajustement de l'erreur comme celui de Newman-Keuls que nous employons régulièrement pour ce type d'étude.

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.

Remplacer : Ces approches nécessitent la présence du réseau neuronal et de l'environnement extracellulaire qui sont uniquement accessibles dans le cerveau intègre. Il n'est donc pas envisageable d'utiliser des méthodes de substitution à l'animal entier.

9821

Un besoin d'innovation dans la thérapeutique antalgique est primordial et attendu. L'arsenal thérapeutique que nous possédons actuellement présente une efficacité limitée et/ou des effets indésirables importants. De plus, 64% des personnes traitées rapportent un soulagement modéré sur le long terme. Partants d'antalgiques ayant montré leur efficacité en clinique, nous émettons l'hypothèse que l'analyse de leur mécanisme d'action pourrait conduire à l'identification de cibles cliniquement pertinentes pour la conception de nouveaux antalgiques plus efficaces et présentant un meilleur ratio bénéfice-risque. C'est dans cet objectif que différentes cibles moléculaires sont analysées par l'intermédiaire de stratégies pharmacologiques et/ou génétique pour comprendre l'implication de celles-ci dans les effets antalgiques du paracétamol. Afin d'être au plus près de la clinique, des modèles de douleur pertinents seront utilisés pour évaluer son effet anti-nociceptif. Notre laboratoire possède une grande expertise pour la conception et la mise en place de modèles de douleurs mimant les conditions cliniques de l'utilisation des antalgiques étudiés. L'évaluation de la douleur chez ces modèles sera réalisée par différents tests très standardisés et utilisés au laboratoire (et d'autres) depuis plusieurs années autant chez le rat que chez la souris.

1580 souris et 1240 rats sont à prévoir sur 3 ans.

Objectifs 1 : Quelles sont les cibles moléculaires impliquées dans l'effet du paracétamol ?

Nous avons déjà montré que l'action antalgique du paracétamol était dépendante de l'enzyme FAAH, des récepteurs TRPV1, Cav3.2 et CB1 grâce à une stratégie pharmacologique ou génétique. D'autres cibles sont envisagées et seront testées pharmacologiquement dans l'effet antalgique du paracétamol : il s'agit par exemple des récepteurs PPAR, CB2, mGLUR5. Nous désirons aussi savoir si leur action est spinale ou supra-spinale. Pour ceci, les différents agonistes ou antagonistes pourront être injectés par voie intrathécale (i.t.) ou intracérébroventriculaire (i.c.v.).

Objectifs 2 : Quelle zone cérébrale est impliquée dans l'effet du paracétamol ?

Nous souhaitons savoir quelles sont les zones cérébrales modulées par le paracétamol. Pour ceci, nous utiliserons une technique d'imagerie par résonance magnétique chez le rat anesthésié après administration de paracétamol en présence ou non de l'inhibiteur de la FAAH.

Ceci nous permettra de nous focaliser sur une zone cérébrale d'intérêt afin d'administrer, par une technique de microinjection chez le rat, soit directement le paracétamol ou ses métabolites, soit d'administrer des antagonistes des récepteurs TRPV1, CB1 ou inhibiteurs FAAH dans cette zone

et d'étudier leur impact sur l'effet antalgique du paracétamol. De la même manière, nous désirons antagoniser/inhiber d'autres cibles dans cette zone (Cav3.2, PPAR, CB2, mGLUR5).

Nous désirons également suivre les modifications des neurotransmetteurs dans ces zones cérébrales ou au niveau de la moelle épinière après administration de paracétamol. Pour ceci, nous mettrons en œuvre une technique de micro dialyse chez le rat.

Objectifs 3 : L'ensemble de ces résultats nous permet de proposer une nouvelle stratégie thérapeutique analgésique : celle d'une vectorisation pharmacologique activant le récepteur TRPV1 uniquement au niveau cérébral. En effet, une activation du récepteur TRPV1 périphérique induit une douleur alors qu'une activation cérébrale induit une analgésie. À l'instar du paracétamol, nous désirons développer des molécules analogues au paracétamol, qui devront être métabolisées par la FAAH cérébrale pour former in situ un composé pouvant activer le récepteur TRPV1 et donc permettre une analgésie. Nous avons établi une collaboration avec une équipe de chimiste afin de synthétiser des molécules qui devront être plus stables, mieux métabolisées par la FAAH pour donner des métabolites présentant une meilleure affinité pour le récepteur TRPV1 que le paracétamol. Nous avons démontré la preuve de concept de cette stratégie en démontrant qu'un analogue du paracétamol, le HMBA, est capable d'induire une analgésie dépendante de la FAAH et du récepteur supra-spinal TRPV1.

Dans l'ensemble de ces objectifs, nos activités s'inscrivent dans le respect de la règle des « 3R » autant que possible. Le remplacement ne peut ici s'effectuer puisque la douleur ne peut être appréciée que dans un modèle vivant intégré. Le raffinement est ici réalisé par une méthodologie stricte nécessaire pour des expériences de comportement : travail en blocs, expérimentateur identique pour une expérience donnée, travail en aveugle, manipulation réalisée dans un contexte calme, etc... La réduction maximale du nombre d'animaux est réalisée par une étude bibliographique afin d'éviter toute manipulation répétitives, par une méthodologie rigoureuse permettant des données très homogènes, un calcul statistique préliminaire du nombre d'animaux, etc.

9822 Chaque jour, l'Homme est exposé à des contaminants qui peuvent être infectieux (appelés alors pathogènes) et qu'il faut combattre pour prévenir les maladies. L'Homme dispose d'un système de protection contre ces infections : le système immunitaire. Ce système comprend un certain nombre de cellules qui s'activent lorsqu'une substance étrangère pénètre l'organisme vivant. L'un des groupes cellulaires les plus importants est un sous-ensemble de globules blancs : les lymphocytes T. Les cellules infectées seront reconnues par ces lymphocytes T et seront ensuite éliminées pour contrôler ou supprimer l'infection. Les lymphocytes T spécifiques pour des pathogènes sont générés par l'organisme lors d'infection ou de vaccination et persistent chez l'individu pour fournir une immunité à long terme contre une réinfection (ceux-ci sont des lymphocytes T mémoires). Bien qu'on sache depuis longtemps que les cellules T mémoires peuvent être trouvées dans la circulation, il est maintenant clair que certaines d'entre elles se logent dans des tissus tels que les « surfaces » corporelles où elles forment une barrière contre une nouvelle infection. Parmi ces surfaces, on compte la paroi épithéliale interne du poumon, de l'intestin, la peau et les voies génitales (combinées, elles sont les principaux points d'entrée d'organismes infectieux). Ces lymphocytes T alors appelés résidents possèdent une mémoire face à l'infection et se caractérisent par leur immobilité, leur capacité à maintenir un tissu dans son état initial - et en tant que tels nous pensons qu'ils ne recirculent pas via le sang. En plus des surfaces de l'organisme, les lymphocytes T peuvent également résider dans d'autres organes comme les tissus nerveux (cerveau et nerfs sensoriels) et le foie. Là, ils contrôlent les infections persistantes par des agents tels que le virus de l'herpès simplex (VHS), qui autrement se réactiverait en l'absence du contrôle exercé par ces lymphocytes T résidents localement. Un autre facteur important dans la protection contre les agents pathogènes envahissants est le système nerveux périphérique. Initialement, le système nerveux et le système immunitaire étaient considérés comme remplissant des fonctions bien distinctes. La frontière les distinguant s'estompe cependant et ces deux systèmes sont considérés comme deux composantes d'un mécanisme de défense unifié. Par exemple, le VHS-1 infectant la peau ou l'épithélium des muqueuses pénètre dans les nerfs sensoriels où il peut persister et induire une nouvelle charge de morbidité. Notre but est de découvrir dans un premier temps comment le

système nerveux régule la réponse immunitaire pendant une infection au VHS-1. Par conséquent, nous nous concentrerons sur les lymphocytes T spécifiquement induits lors de l'infection par VHS-1 et sur les lymphocytes T dendritiques chargés d'activer ces lymphocytes T spécifiques à l'infection. Et dans un second temps, nous nous attarderons à déterminer si une sous-population précise de neurones sensoriels peut être ou non à l'origine des modulations du système immunitaire observées post-infection virale. Pour ce faire, nous utiliserons deux souches de souris, l'une dépourvue de nerfs sensoriels (NAV1.8 DTA) et l'autre contrôlée possédant tous ses nerfs sensoriels (DTA, souris de contrôle de portée). Nous estimons que pour répondre convenablement aux réponses scientifiques soulevées, le nombre minimal de souris nécessaires s'élèverait à 380 souris NAV1.8DTA, 380 souris contrôles de même portée DTA et 90 souris C57Bl/6 pour l'élaboration de tests. Les effectifs d'animaux nécessaires seront réduits au minimum selon la loi des 3R. Des lots de cinq souris seront constitués pour chaque condition testée afin de répondre aux exigences de test statistique de rang non paramétrique (Mann Whitney). Les expériences seront reproduites au moins une fois afin de s'assurer de la reproductibilité biologique des résultats. Les souris seront hébergées en cages standard à toit ouvert (couvercles à filtre) avec de la sciure de bois utilisée comme litière, des rouleaux de coton comme matériau de nidification et de maisons de souris achetées dans le commerce et fournies pour l'enrichissement environnemental. Les souris ont un accès ad libitum à un bidon d'eau classique et à un régime alimentaire standard. Les souris ne seront pas logées séparément et sont libres de leur déplacement. Pour répondre à la problématique « Réduction de la douleur » imposée par la loi des 3R, les animaux seront anesthésiés avant toutes manipulations le nécessitant selon les chartes éthiques en vigueur, soit par inhalation de gaz anesthésique vetisoflurane soit par injection d'un mélange anesthésique général. En parallèle, une observation quotidienne des animaux vigiles sera réalisée après leur infection et consistera en une vérification du poids, de la vivacité et de l'état du pelage des animaux avant de continuer l'expérience ou non en fonction des signes vitaux observés. Au besoin et au moindre signe de dégradation de l'état général, d'autres points d'observation intermédiaires seront assurés. Une souris qui aura perdu 20% de son poids initial sera systématiquement euthanasiée. De même, une modification drastique et évidente du comportement de l'animal (prostration, paralysie, arrêt du toilettage, perte de l'activité d'exploration) sera retirée de l'étude et euthanasiée. Ces critères nous permettent de respecter les points limites d'expérimentation établis. L'importance et la complexité des nombreuses interactions cellulaires nécessaires au développement du système immunitaire ainsi qu'à la mise en place d'une réponse immunitaire suite à la stimulation des neurones sensoriels périphériques via une infection virale justifient l'utilisation de modèles d'études in vivo.

9823 Aujourd'hui, les vaccins antigrippaux sont la pierre angulaire de la prévention de la grippe avec environ 500 millions de doses administrées chaque année. Les vaccins grippaux actuels sont conçus pour protéger contre trois ou quatre souches : deux souches A (A/H1N1 et A/H3N2) et une ou deux souches B (B/Yamagata et/ou B/Victoria).

Les souches B sont une des causes principales d'épidémie de grippe survenant tous les deux à quatre ans et peuvent être à l'origine de taux de mortalité excessifs dans tous les groupes d'âges. La circulation d'une souche B différente de celle qui existe dans le vaccin de la saison, illustre le caractère imprévisible des souches B circulantes et du besoin d'un vaccin contre la grippe qui protège contre les lignées B.

Toutefois, malgré l'existence de vaccins contre la grippe, plus de 250000 décès par an sont enregistrés. La grippe reste alors un fardeau médical lourd et il y a encore des besoins non satisfaits, avec deux éléments clés :

- 1) la protection des populations âgées qui ne répondent pas bien aux vaccins actuels,
- 2) la nécessité d'une protection croisée contre plusieurs virus de la grippe qui seraient modifiés en raison de la dérive antigénique (changements observés lors des variations saisonnières) ou de cassure antigénique (profonds changements en raison de l'émergence d'un nouveau virus pandémique).

Ce projet a pour objectif d'améliorer les vaccins actuels contre la grippe, en ouvrant la voie vers le développement clinique d'un nouveau candidat-vaccin qui sera utilisé en combinaison avec les vaccins saisonniers. Ce projet permettra donc d'évaluer l'efficacité de ce nouveau candidat vaccin

et de comprendre les réponses immunitaires induites afin de mieux traiter les patients atteints de grippe ; avec principalement une activation de la réponse cellulaire lors d'une vaccination ainsi que la génération d'une mémoire immunitaire efficace.

La réponse immunitaire est un phénomène biologique complexe faisant intervenir de multiples types cellulaires et une organisation unique qui rend impossible son étude dans des tests *in vitro*, c'est pour cette raison que le modèle expérimental chez la souris est indispensable et ne peut pas être remplacé mais les expérimentations sont planifiées de manière à utiliser le plus petit nombre d'animaux permettant l'obtention de résultats exploitables et la règle des 3R : "Réduire, Remplacer et Raffiner", est prise en compte et respectée dans ce projet ainsi que les conditions d'élevage, d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage que pourraient ressentir les animaux. Ce projet nécessitera l'utilisation de 80 souris au maximum.

Le but de notre projet est donc d'étudier les mécanismes et compléter l'évaluation pharmacologique de notre protéine en tant qu'immunostimulant pour induire une réponse immunitaire de type cellulaire capable de protéger contre différents virus. Précisément, les expérimentations prévues sont des immunisations par injection intramusculaire chez la souris, afin d'évaluer l'efficacité de la réponse immunitaire induite par la protection des souris vaccines contre l'infection de deux souches virales de la grippe.

9824 Nous étudions le rôle des cytokines dans l'inflammation cutanée lors des maladies inflammatoires chroniques de la peau et dans la cicatrisation cutanée normale ou pathologique. 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. Ainsi nos travaux ont montré l'implication de certaines cytokines dans la physiopathologie de l'inflammation aiguë ou chronique dans ces modèles *in vitro*. Si l'action de ces cytokines peut être étudiée *in vitro*, le grand nombre d'effecteurs cellulaires et moléculaires impliqués rend obligatoire la modélisation *in vivo* chez la souris, une espèce couramment utilisée en immuno-dermatologie. Parmi les pathologies inflammatoires cutanées qui nous intéressent, certaines peuvent être induites chez la souris. Ainsi, l'application topique d'Aldara 5% (crème contenant de l'Imiquimod, IMQ) sur l'oreille et le dos de la souris pendant 7 jours est classiquement utilisée pour induire une dermatite psoriasiforme chez l'animal. De même la cicatrisation cutanée septique peut être reproduite chez la souris par excision de petits fragments de peaux et infection par différents pathogènes habituels de la peau. Le contrôle de cette inflammation et/ou le contrôle de l'infection par de nouvelles molécules appliquées directement sur les lésions cutanées est une voie de recherche importante. Ainsi notre étude vise à déterminer l'effet de molécules anti-inflammatoires ou antimicrobiennes sur la dermatite psoriasiforme et sur la cicatrisation et de comprendre leur mode d'action en caractérisant les cytokines présentes. Ces travaux pourraient à terme améliorer la prise en charge des patients présentant des lésions chroniques en ciblant l'inflammation et/ou l'infection. Un total de 4320 souris au maximum sera nécessaire pour mener à bien ce projet. Concernant le respect de la règle des 3R, cette étude *in vivo* utilise la souris, une espèce couramment utilisée en vaccinologie. Son système immunitaire et ses réponses humorales et cellulaires ont été largement décrits depuis de nombreuses années, et font référence dans le domaine et évitent d'avoir recours à des espèces mammifères plus proches de l'homme ou d'espèces bovines. Nous avons réduit au maximum le nombre d'animaux nécessaires en expérimentation tout en s'assurant d'en avoir le nombre suffisant pour une étude interprétable sur le plan statistique. Si des expériences préliminaires peuvent être réalisées *in vitro* sur des modèles de peau reconstituée, il n'est pas encore possible d'intégrer *in vitro* tous les acteurs cellulaires et moléculaires présents *in vivo*. Ces stratégies *in vitro* ne peuvent donc pas remplacer les modèles de dermatite ou de plaies septiques *in vivo* que nous souhaitons utiliser. La notion de raffinement a été appréhendée à travers les conditions d'expérimentation et d'élevage qui sont optimisées (hébergement enrichi) 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 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, déclenchant la mise en place d'un traitement analgésique ou leur euthanasie.

9825 Chez l'Homme, 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. Elle est produite à partir d'une molécule simple : un acide aminé, la tyrosine qui est d'abord transformée dans le cerveau en L-DOPA puis en dopamine. La conversion de la L-DOPA en dopamine se fait grâce à une enzyme appelée décarboxylase des acides aminés aromatique (AADC). Le seul moyen actuel de soigner la maladie de Parkinson n'est pas curatif, il consiste à donner aux malades de la L-DOPA pour compenser l'absence de dopamine. Cela permet de traiter efficacement pendant un certain temps les symptômes moteurs de la maladie. Malheureusement, ce traitement chronique finit par provoquer l'apparition de complications motrices sévères sous forme de mouvements involontaires anormaux appelés dyskinésies, ce qui contrecarre le gain procuré par la L-DOPA et affecte beaucoup la qualité de vie des patients. De nouvelles voies thérapeutiques sont donc activement recherchées. Une de ces voies est de travailler sur l'hypothèse que plusieurs données suggèrent : la L-DOPA pourrait être un neurotransmetteur et aurait des effets indépendants de sa conversion en dopamine. Pour tester cette hypothèse, nous proposons de bloquer la synthèse de l'enzyme AADC dans les neurones dopaminergiques de la substance noire chez le rat afin qu'ils ne produisent plus de dopamine mais seulement de la L-DOPA. Notre stratégie expérimentale utilisera la technique d'édition du génome *crispr/cas9* pour inactiver le gène AADC dans la substance noire puis d'évaluer le comportement moteur des animaux.

L'analyse des neurones sera ensuite effectuée sur le cerveau des animaux prélevés après leur mise à mort.

L'analyse des effets sur le comportement moteur nous contraint à utiliser des animaux. Dans le respect de la règle des 3R, le remplacement est effectué par la validation des molécules capables de bloquer la synthèse de l'AADC *in vitro* sur cellules en cultures (PC12). Pour réduire le nombre d'animaux utilisés, une analyse de puissance a été effectuée, permettant de limiter le nombre à 58 rats incluant les groupes expérimentaux et leurs contrôles. Pour le respect du R de raffiner, nous avons vérifié qu'aucune donnée actuelle n'indique que l'inactivation de l'AADC soit susceptible d'entraîner une souffrance chez les animaux, et nous utilisons des tests comportementaux faisant appel au comportement spontané de l'animal afin de limiter l'angoisse et le stress. Toutes les souffrances liées aux chirurgies seront soulagées par les molécules les plus adaptées. Le bien-être des animaux sera pris en compte à chaque étape.

9826 Les poux sont des ectoparasites obligatoires des mammifères et d'oiseaux avec plus de 3000 espèces décrites. Les poux qui parasitent l'homme appartiennent à deux familles dont les membres sont strictement hématophages, on distingue ainsi le pou de tête, le pou de corps et le pou pubien. Les poux de corps nichent dans les replis et les coutures des vêtements. Le pou de corps peut causer des nuisances par ses piqûres (pédiculose corporelle) mais il est aussi connu comme vecteur de pathogènes responsables de maladies infectieuses (typhus épidémique, la fièvre des tranchées et la fièvre récurrente à poux).

L'objectif de ce projet est d'utiliser les lapins pour maintenir l'élevage des poux humains, qui est nécessaire aux différents sujets d'étude liés à cet arthropode. Il n'y a pas de travaux publiés concernant le maintien de poux grâce à des systèmes artificiels de gorgement. Cependant, notre laboratoire a déjà l'expérience de ce genre de systèmes, notamment pour le maintien de nos différents élevages d'arthropodes hématophages. De nombreux essais ont été conduits ces dernières années pour tenter de nourrir les poux de façon artificielle. Cela conduit à une très forte mortalité de ces arthropodes, et une très faible ponte des femelles restantes, ceci empêchant d'obtenir un élevage pérenne. L'utilisation d'animaux est donc indispensable pour obtenir un gorgement optimal sans mortalité, ainsi qu'une descendance de façon stable. Le lapin a été choisi car, de par sa taille, il permet de réduire le nombre d'animaux impliqués dans le projet. Il permet de

nourrir en une seule fois, plusieurs centaines de poux sans que cela ne soit une source de souffrance. Seuls quatre lapins par an seront utilisés en alternance pendant la durée totale de ce projet (5 ans), ce qui fait un total de 20 lapins. Les poux doivent être nourris 3 fois par semaine, les lapins seront utilisés en alternance pour chaque gorgement. Approximativement, chaque lapin sera donc utilisé 4 fois par mois, soit 48 fois par an.

Les animaux seront hébergés individuellement car les lapins femelles New Zealand peuvent se montrer territoriales et se battre lorsqu'elles sont hébergées à plusieurs. Elles sont en revanche hébergées face à face dans un environnement calme, visitées chaque jour et manipulées même en dehors des procédures expérimentales par du personnel formé. Chaque cage est équipée d'une plate-forme et d'une cachette, ainsi que de palets à ronger. La souffrance animale est contrôlée pendant et après les procédures expérimentales. Un onguent ophtalmique est appliqué pendant l'anesthésie et les animaux sont attentivement surveillés après le gorgement des poux. Notre expérience nous montre que les piqûres de poux ne causent visiblement pas prurit chez le lapin. Cependant, toute manifestation d'inconfort sera soulagée par l'application d'une crème anti-démangeaisons et tout signe de douleur entraînera l'arrêt de la procédure.

9827 La plateforme réalise une palette de prestations de service très large, allant de la mise à disposition des équipements IRM à la réalisation d'expériences IRM selon les besoins du demandeur. Dans ce contexte, la plateforme est amenée à accueillir temporairement, à la journée, des animaux extérieurs à l'établissement utilisateur dont elle dépend.

Ces animaux sont déjà inclus dans une autorisation de projet rattaché à l'établissement utilisateur concepteur dont dépend le demandeur de la prestation de service. Ils entrent sur la plateforme IRM préclinique pour y subir un protocole d'imagerie puis repartent dans leur établissement d'origine ou sont euthanasiés sur place en accord avec le protocole expérimental.

Les objectifs de l'imagerie sont (i) la mise en évidence de lésions ou anomalies dans des modèles animaux de pathologies et l'identification de leurs caractéristiques physiologiques (métabolisme, perfusion, présence d'œdème,...), (ii) le suivi de l'évolution de ces lésions et de leurs caractéristiques au cours du temps après traitement.

Dans ce contexte de prestations de service, la plateforme n'est pas en mesure de déposer des demandes d'autorisation pour tous les animaux qu'elle accueille et dont elle n'a pas responsabilité globale du projet.

Cette demande a pour objectif d'autoriser uniquement les protocoles d'imagerie mis en œuvre sur la plateforme pour le compte des responsables de projet extérieurs à l'établissement utilisateur dont elle dépend. La plateforme s'engage à vérifier que les projets qu'elle accueille ont reçu un avis favorable de la part du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche avant toute expérimentation dans ses locaux.

Les projets accueillis sur la plateforme concernent l'étude de pathologies et leur suivi thérapeutique. Il est impossible de remplacer l'animal vivant par un modèle cellulaire ou de simulation informatique car il est nécessaire de prendre en compte (i) les interactions des cellules malades avec les autres cellules de l'organe voire des autres organes, qui peuvent modifier le comportement et les réponses des cellules malades, (ii) les modifications possibles du médicament dans l'organisme avant d'atteindre la cellule ciblée.

Cette demande d'autorisation est formulée pour un quota de 1000 animaux (500 rats + 500 souris) sur une durée de 5 ans. Un décompte des animaux extérieurs imagés sera tenu et une nouvelle demande sera déposée si le quota est dépassé avant la fin de la période de 5 ans. Ce nombre d'animaux a été déterminé sur la base des statistiques d'utilisation de la plateforme des années précédentes. Il faut savoir que l'imagerie permet de réduire le nombre d'animaux utilisés par rapport aux statistiques car elle permet (i) de visualiser de façon non traumatique des lésions internes à l'animal, non visibles autrement, (ii) de constituer des groupes avec des lésions homogènes (en termes de taille ou caractéristique), (iii) de suivre les mêmes animaux au cours d'un traitement.

Au cours des acquisitions IRM, l'animal est anesthésié, constamment réchauffé et la fréquence respiratoire enregistrée permet de suivre son état et de réguler le niveau d'anesthésie. L'acquisition des données IRM n'engendre pas d'autre douleur que celle éventuellement induite par le bruit lié au type de séquence utilisée. L'anesthésie générale durant toute la durée de l'expérimentation

suffira à la supprimer. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'imagerie et évalué grâce à une grille codifiant le niveau de douleur par rapport aux points limites définis pour les procédures expérimentales mises en œuvre. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance.

9828 Ce projet s'inscrit dans le cadre d'un programme de recherche destiné à identifier de nouvelles molécules permettant de traiter la fibrose hépatique. Ce stade de la pathologie est défini par l'accumulation excessive de fibrose conduisant à la dégénérescence du foie. Le tissu fibrotique est un tissu cicatriciel visant à protéger le foie des agressions et ce quelle qu'en soit l'origine : qu'elle soit d'origine toxicologique (alcoolique, environnementale ou liée à l'exposition à certains médicaments), virale ou métabolique. C'est une complication majeure qui conduit si elle n'est pas traitée à des formes beaucoup plus graves, la cirrhose (avec de nombreuses complications : hémorragies digestives liées à l'hypertension portale avec rupture de varices œsophagiennes et/ou gastriques, ascite, encéphalopathie liée à l'accumulation d'urée au niveau sanguin et pathologie hépatorénale) et l'hépatocarcinome qui en est la forme la plus grave. Les maladies chroniques hépatiques restent bien souvent silencieuses jusqu'à un stade avancé, aussi nécessitent-elles un traitement curatif visant endiguer le phénomène fibrotique et de régénération des tissus sains. A ce jour, aucune molécule n'a reçu d'autorisation de mise sur le marché pour le traitement de la fibrose hépatique. Aussi, plusieurs voies de recherche et de développement sont en cours pour palier à ce déficit. Afin d'étudier et d'étayer nos hypothèses lors du développement de nos molécules, il nous sera inévitable d'avoir recours à des modèles animaux présentant une pathologie similaire à celle qui se produit chez l'Homme. Les méthodes alternatives ne permettent pas de reproduire la pathologie telle que présente chez l'homme, cependant une première phase de sélection des meilleurs composés est effectuée sur des modèles moins éprouvés acellulaires ou cellulaires, visant à réduire le nombre d'animaux utilisés comme nous le rappelle la règle des 3R. Il existe plusieurs méthodes pour induire expérimentalement une fibrose hépatique chez l'animal de laboratoire. Nous utiliserons le modèle de fibrose hépatique induit par l'administration chronique de tétrachlorure de carbone (CCl₄) chez le rat. Le tétrachlorure de carbone est un agent cytotoxique activé dans le foie et devient une espèce radicalaire puissante et très nocive pour les cellules hépatiques. Les radicaux libres ainsi générés induisent une peroxydation lipidique qui participe à la nécrose cellulaire et à l'initiation d'une cascade inflammatoire qui favorise le développement d'une fibrose hépatique. Les procédures expérimentales utilisées dans ce projet sont de classe sévère et seront réalisées dans les conditions les moins stressantes possibles pour les animaux. Les molécules ayant prouvé un potentiel thérapeutique dans ces études feront alors l'objet d'une évaluation chez l'animal. De plus, il ne sera effectué sur les animaux que le nombre strict de prélèvements sanguins, en volume et en fréquence, compatibles avec la physiologie de l'animal. Les animaux seront sous observation quotidienne et aucun animal en détresse ou en souffrance ne sera maintenu dans cet état, il serait euthanasié par une méthode humaine adaptée le cas échéant. Par ailleurs, l'hébergement des animaux pendant la phase d'acclimatation et pendant l'expérimentation sera faite avec enrichissement du milieu afin d'améliorer leur bien-être. Cette stratégie nous permet de définir préalablement des points limites éthiquement et scientifiquement acceptables, en tenant compte des objectifs de l'étude. A terme, nos travaux pourraient ouvrir de nouvelles voies de traitement de certaines formes de maladies hépatiques chroniques, aujourd'hui ce besoin médical est clairement établi. Ce projet engagera des rats et dans un nombre estimé à 2232 individus pour la durée que couvrira ce projet. Le nombre d'animaux utilisé dans chaque lot de chaque procédure est réduit, il correspond au seuil minimal qui puisse nous permettre d'apprécier, avec nos moyens techniques et en fonction de la variabilité inter individus, les effets désirés.

9829 Notre recherche porte sur l'étude des cellules souches dans la glande mammaire, qui sont très probablement à l'origine du cancer du sein. Nous étudions une voie de signalisation qui a un rôle central dans le développement et le maintien des cellules souches. Nous avons récemment développé une collection unique de souris transgéniques qui nous permettent d'évaluer l'expression d'un récepteur spécifique dans les cellules souches normales et tumorales in vivo. L'organisation, le développement et la fonction de la glande mammaire sont très semblables chez les souris et les

humains. Le modèle murin est donc essentiel pour étudier le développement et la tumorigenèse dans ce tissu. Notre stratégie repose essentiellement sur l'analyse du développement in vivo de la glande mammaire dans nos modèles de souris transgéniques. Pour les expériences pilotes, il est prévu d'étudier le phénotype de différentes lignées transgéniques, conduisant à l'analyse d'environ 45 souris au total.

L'objectif premier du travail proposé est de visualiser la dynamique des cellules souches mammaires lors du développement de la glande mammaire et de la formation de tumeurs en utilisant nos modèles de souris transgéniques.

Toutes les souris transgéniques qui seront utilisées dans le projet sont viables et n'ont pas de problèmes de santé. Les modèles de tumeurs que nous utiliserons ne causeront pas de souffrance car les souris seront mises à mort avant que les tumeurs ne dépassent une taille spécifique et ces tumeurs seront collectées selon les règles d'éthique. Les interventions sur les souris vivantes incluent des injections intra-péritonéales non douloureuses et une chirurgie légère pour l'insertion d'implants hormonaux à libération lente. Toutes les précautions sont prises pour minimiser la souffrance, par ex. l'anesthésie pour les interventions chirurgicales et l'administration d'analgésiques post-opératoires et une surveillance étroite de la souris. Le nombre de souris utilisées est ajusté au plus bas, mais compatible avec l'obtention de résultats statistiquement fiables. Pour minimiser le nombre d'animaux, des informations seront obtenues au niveau macroscopique, cellulaire et moléculaire à partir du même animal en prélevant toutes les glandes mammaires et les tumeurs de chaque souris pour une analyse en aval. Des tumeurs dépendantes des hormones apparaissent dans nos lignées de souris transgéniques. Cependant, pour fournir les hormones nécessaires (œstrogène et progestérone), les souris doivent subir des gestations en série. Dans cette étude pilote, nous testerons si nous pouvons induire un développement de la tumeur en fournissant les hormones requises (soit en utilisant des implants d'hormones à libération lente soit par administration en intrapéritonéal) au lieu de la gestation. Ceci permettra de réduire encore le nombre d'animaux utilisés car les souris n'auront plus besoin d'être croisées et de générer des portées. Nous comptons également sur des méthodes alternatives qui remplacent l'utilisation des animaux, à savoir les cultures organotypiques 3D (organoïdes) et explants, pour modéliser le développement mammaire et le comportement des cellules souches in vitro, ce qui réduira le nombre d'animaux requis. Cependant, les expériences in vivo chez la souris sont nécessaires, afin d'étudier la morphogenèse des glandes mammaires et la tumorigenèse dans leur microenvironnement naturel et leur contexte physiologique. Les expériences proposées sont donc nécessaires pour atteindre les objectifs de notre projet, qui vise à contribuer à une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires régissant la fonction des cellules souches et leur rôle dans le développement de la tumeur.

9830 Les maladies cardiovasculaires représentent la première cause de mortalité dans le monde, aussi bien dans les pays développés que dans ceux en voie de développement. Les événements cardiovasculaires graves, comme l'infarctus du myocarde ou l'accident vasculaire cérébral (AVC) ischémique, sont dus à une rupture des plaques d'athéromes qui se sont développées dans les artères, notamment dans les artères coronaires ou dans les artères carotides. L'une des étapes initiales du développement des plaques d'athérome est l'infiltration de graisses dans la paroi des artères dans certaines zones privilégiées comme les courbures ou les bifurcations.

De nombreuses études épidémiologiques et interventionnelles ont montré que l'alimentation joue un rôle important dans le développement des plaques d'athérome et la survenue des événements cardiovasculaires adverses graves (infarctus, AVC, angine de poitrine, etc.). Ainsi, le régime méditerranéen, riche en polyphénols, est associé de façon significative avec une réduction du risque de survenue d'un premier événement cardiovasculaire mais aussi d'une récurrence.

Le but du présent projet est donc d'évaluer, d'une part, l'effet protecteur d'extraits végétaux riche en polyphénols sur le développement initial des dépôts lipidiques dans la crosse aortique d'un modèle murin d'athérosclérose et, d'autre part, d'identifier les molécules polyphénoliques et leurs métabolites majeurs présents dans le sang et les tissus après consommation des extraits.

Le nombre maximal d'animaux utilisés pour ce projet est de 60 souris du fait de l'application de la règle des 3R. Le remplacement du modèle animal par un autre modèle n'est pas possible du fait

que les altérations vasculaires et cardiaques sont des processus complexes issus des interactions multi-tissulaires dans l'organisme. La réduction des effectifs est liée à l'utilisation de techniques et d'approches statistiques adaptées (ANOVA et/ou tests non-paramétriques). Enfin, le raffinement se fait par une prise en compte du bien-être animal (enrichissement du milieu et soins quotidiens aux animaux).

9831 L'augmentation de l'espérance de vie au cours du siècle dernier est le reflet direct de l'amélioration du niveau de vie. Elle s'accompagne cependant d'une explosion spectaculaire de l'incidence des maladies liées à l'âge, maladies qui nuisent à la qualité de vie des personnes âgées. Permettre à ces personnes de rester actives et en bonne santé est ainsi devenu un défi majeur.

Or le vieillissement s'accompagne de changements importants dans la fonction et la composition du sang, conduisant à une diminution des défenses immunitaires, à une susceptibilité accrue aux infections et à une diminution de la réponse à la vaccination. Ces anomalies liées à l'âge résultent en grande partie d'altérations au niveau des cellules souches produisant les cellules sanguines : les cellules souches hématopoïétiques (CSH). Les mécanismes induisant cette altération restent encore très mal connus.

Des résultats préliminaires obtenus *in vitro* suggèrent que l'inflammation chronique, possiblement induite par des bactéries de l'intestin vieillissant, peut conduire à une modification de la structure des noyaux des CSH et ainsi inhiber leur capacité à produire des cellules sanguines. Pour vérifier cette hypothèse, nous désirons mettre en œuvre un modèle d'inflammation chronique chez la souris qui permettra de suivre l'impact de cette inflammation sur les CSH présentes dans la moelle osseuse. Les bénéfices attendus du projet sont une amélioration de notre compréhension du rôle de l'inflammation chronique dans le vieillissement des CSH et l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques pour le développement de médicaments dans le but d'améliorer l'immunité chez les personnes âgées.

Pour ce projet, nous utiliserons un protocole déjà établi et couramment utilisé dans le domaine. Une inflammation chronique à bas bruit sera induite par l'injection dans la cavité abdominale de petites quantités de molécules d'origine bactérienne (le LPS) sur une période de 4 semaines. Les doses injectées ont été ajustées pour maintenir le bien-être des souris. Un suivi quotidien des souris en expérimentation sera effectué afin de détecter tous signes de souffrances (altérations physiques et/ou comportementales) qui conduiront à leur euthanasie par la méthode réglementaire. Nous utiliserons à la fois des souris transgéniques (n'exprimant pas des molécules clés dans la réponse aux stimuli inflammatoires) et des souris non génétiquement modifiées.

Le nombre d'animaux que nous estimons nécessaire repose sur notre expérience de la conception d'études de ce type. Nous utiliserons le nombre minimum d'animaux nécessaire pour obtenir des résultats significatifs (6 à 9 souris par condition d'analyse) soit un total de 1604 souris sur toute la durée du projet (3 ans). La preuve de concept de ce projet a déjà été réalisée *in vitro*. Le recours à l'animal est nécessaire car nous cherchons désormais à caractériser les liens qui existent entre le vieillissement de différentes parties du corps (molécules bactériennes venant de l'intestin vieillissant ayant un effet sur les cellules souches hématopoïétiques dans la moelle osseuse). Ces liens ne peuvent être étudiés que dans le contexte d'un animal entier permettant de mimer une situation similaire chez l'homme. L'ensemble de ce projet respectera donc la règle des 3R (remplacement, réduction et raffinement).

9832 Il existe au sein du cœur un certain nombre de circuits neuronaux assurant la modulation de la fonction cardiaque. De récentes découvertes supportent le concept qu'un remodelage de ces structures, suite à une atteinte cardiaque (infarctus, insuffisance cardiaque), conduirait à l'émergence de troubles du rythme. Pour autant, il n'existe encore que très peu d'études fonctionnelles portant sur les neurones intracardiaques. Une difficulté pour de telles études est de pouvoir cibler spécifiquement l'activité de certains neurones cardiaques pour comprendre leur rôle. L'objectif de ce projet est d'utiliser les techniques d'optogénétique afin de pouvoir étudier spécifiquement l'influence de ces neurones sur l'activité cardiaque. En effet, l'optogénétique est une technique qui permet, grâce à l'expression ciblée de protéines photosensibles dans les neurones, de stimuler ou d'inhiber leur activité grâce à des flashes de lumière. Ceci permettra de comprendre

le rôle de ces neurones dans le fonctionnement normal et pathologique du cœur et permettra donc d'évaluer leur importance en termes de futures cibles thérapeutiques. Les souris utilisées permettront une expression ciblée des outils optogénétiques dans les neurones sensoriels cardiaques.

L'étude de l'influence des neurones sensoriels sur les propriétés électriques et contractiles du cœur par stimulation lumineuse sera réalisée in vivo sur animal anesthésié par l'approche d'une fibre optique par la cavité abdominale et/ou thoracique et ex vivo après euthanasie de l'animal et prélèvement du cœur. Pour réaliser ces expériences, 80 souris B6.129-Trpv1m1(cre)Bbm/j seront utilisées.

La règle des 3R sera mise en application de la façon suivante :

Remplacement : il n'est pas possible de satisfaire au critère de Remplacement des animaux par d'autres préparations biologiques puisque l'objet de l'étude est justement de tester la commande in vivo du cœur par la stimulation lumineuse des neurones sensoriels.

Réduction : Réduction au minimum du nombre d'animaux tout en gardant ce nombre suffisant pour obtenir des résultats significatifs.

Raffinement : à la fois des conditions d'hébergement des animaux (ambiance améliorée, par exemple diffusion à bas niveau de musique douce) et du protocole expérimental (par exemple surveillance renforcée, utilisation systématique d'un analgésique central (Buprénorphine) avec une attention particulière aux signes pouvant indiquer une douleur de l'animal, et limitation de la durée expérimentale à 1h). Une surveillance et une observation quotidienne du comportement des animaux sont assurées et une pesée hebdomadaire permettra de s'assurer de la bonne santé des animaux durant l'ensemble du protocole.

9833 Les pathologies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité et le vieillissement de la population en accroît l'importance. De plus, des pathologies comme l'hypertension artérielle, le diabète ou les pathologies ischémiques (coronariennes, cérébrales, rénales ou périphériques) surviennent d'autant plus fréquemment que l'âge des sujets avance. De manière générale les femmes sont moins atteintes de maladies cardiovasculaires que les hommes mais cette tendance s'inverse après la ménopause, laissant penser à un rapport de cause à effet entre la production d'hormones féminines (œstrogènes) et une protection des accidents vasculaires. Au laboratoire depuis plusieurs années nous nous intéressons au rôle du récepteur aux œstrogènes dans la fonction vasculaire. Le remodelage aux flux dépend de l'activation des récepteurs alpha (ER α) aux estrogènes. Nous aimerions comprendre le rôle de ce récepteur aux œstrogènes au niveau membranaire dans la réactivité vasculaire ainsi que dans le remodelage artériel en réponse aux modifications de flux et/ou de pression artérielle. Cet aspect sera étudié plus en détail par l'utilisation d'un modèle de souris génétiquement modifiées pour le récepteur membranaire aux œstrogènes. Pour cette étude 1120 animaux seront nécessaires au maximum. Nous appliquons la règle des 3R. Toutes les procédures chirurgicales seront accompagnées d'une analgésie pré- et post-opératoires (injection de Buprénorphine). L'animal sera suivi au réveil et dans les premières heures suivant l'opération, puis quotidiennement. Une grille de score pour l'évaluation de la douleur sera utilisée avec détermination du point limite. Nous ne pouvons pas remplacer ce modèle par un modèle in vitro, car le remodelage vasculaire met en jeu le système immunitaire et hormonal. Nous réduisons au minimum le nombre d'animaux pour obtenir des résultats exploitables au niveau statistique. Nous utiliserons le test de student et des tests d'Anova deux voies avec post-test de Bonferroni. Nous raffinons nos conditions d'expérimentation et d'hébergement pour le bien-être de nos animaux. Les animaux sont hébergés dans des cages aux normes (au minimum par 2 et au maximum par 4) suivant l'âge et le poids des animaux de plus les cages sont enrichies par des jouets.

9834 Les lymphocytes T sont des cellules du système immunitaire capables de détruire les cellules tumorales ou infectées par un virus. Ils circulent dans le corps et passent régulièrement des ganglions au sang, grâce à une molécule appelée S1P. Ce projet vise à comprendre comment les lymphocytes T peuvent recirculer des ganglions vers le sang. Des résultats de nos études précédentes laissent penser qu'une protéine appelée mTOR pourrait avoir un impact sur la circulation des lymphocytes. Afin de vérifier cette hypothèse, nous allons inhiber in vivo l'action de

cette molécule. Nous allons également suivre en temps réel l'entrée et la sortie des lymphocytes dans les ganglions. De nombreux médicaments actuellement utilisés stimulent ou empêchent la migration des lymphocytes. Mieux connaître le mécanisme de migration pourrait mener à la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques.

Ce type de projet ne peut être mené sans utiliser d'animaux car le système immunitaire est un organe extrêmement complexe avec une multitude de cellules constamment en mouvement et organisées en un réseau tridimensionnel impossible à reproduire *in vitro*. Les protocoles proposés répondent à la règle des 3R (Réduire, Raffiner et Remplacer). Le nombre de souris a été calculé afin que les résultats aient une valeur statistique malgré les variations entre les animaux, tout en évitant les mises à mort inutiles. Le nombre d'animaux est donc estimé à 340 souris sur 3 ans. Tout au long du projet, nous veillerons à ce que les conditions d'élevage, d'hébergement et de soins soient les plus adaptées. Par ailleurs, les procédures utilisées dans ce projet n'occasionnent qu'une douleur et une angoisse minimales pour les animaux.

9835 Ce projet consiste à valider une stratégie d'immunothérapie active pouvant être une alternative intéressante aux traitements actuels (immunothérapie passive, injection d'anticorps monoclonaux) dans certaines pathologies infectieuses chroniques ou cancéreuses. Cette nouvelle stratégie combine en effet les bénéfices de la vaccination et de l'immunothérapie passive, c'est à dire une protection immédiate à effet long terme.

Le terme immunothérapie regroupe des stratégies thérapeutiques très différentes selon qu'elles mobilisent ou renforcent les ressources du système immunitaire du malade (immunothérapie active) ou au contraire qu'elles utilisent des réactifs immunologiques apportés de l'extérieur (immunothérapie passive).

La réponse immunitaire humorale correspond à la production de cellules lymphocytaires B, spécifiques d'un antigène donné (agent microbien, virus, produits de cellules cancéreuses), qui patrouillent l'organisme afin de détecter l'intrusion de pathogènes ou cellules anormales dans le corps. La reconnaissance par ces cellules B de l'antigène se fait via un anticorps exprimé à la surface de ces cellules. La rencontre avec un antigène spécifique induit l'activation de ces cellules qui ont la possibilité de se différencier en cellules appelées plasmocytes : ces plasmocytes produisent alors la forme sécrétée de l'anticorps. Les fonctions des anticorps sont multiples et indispensables pour détruire les envahisseurs, seuls ou avec l'aide des autres cellules du système immunitaire. Certaines cellules appelées cellules B mémoires, ont la capacité de perdurer tout au long de la vie de l'individu et permettent une protection à long terme. La vaccination consiste à injecter des formes non dangereuses d'un pathogène à un organisme afin d'éduquer sa réponse immunitaire mémoire et de produire des cellules qui seront alors capables de réagir le moment voulu. Parallèlement, une autre stratégie d'immunothérapie consiste à injecter directement des anticorps monoclonaux très efficaces dirigés contre l'antigène d'intérêt, cette stratégie permet d'induire une protection plus rapide mais sans induire de mémoire immunitaire. L'objectif de ce projet de caractériser une nouvelle forme d'immunothérapie par transfert de gène (thérapie génique) : les cellules seront programmées pour exprimer un anticorps monoclonal d'intérêt. Les cellules B ainsi modifiées pourront tout d'abord produire la forme membranaire de l'anticorps. Lorsqu'elles seront en contact avec la cible (virus ou cellules cancéreuses), elles auront la possibilité de donner les cellules productrices de l'anticorps soluble, et de permettre aux patients de se défendre de manière active contre l'agent infectieux/cancéreux. Il s'agit d'une vaccination par thérapie génique, l'anticorps est choisi pour ses capacités à neutraliser très efficacement la cible. Cette stratégie combine donc l'effet long terme d'une vaccination « classique » et le choix de l'anticorps en terme d'efficacité.

Les vecteurs de transfert de gène ont été validés *in vitro* sur des cellules B. Lors d'un projet parallèle, nous validons l'efficacité de cette stratégie. Dans ce projet, nous souhaitons observer l'effet d'une telle stratégie sur la réponse endogène et aborder des questions plus fondamentales sur l'immunologie de cette thérapie : quelles sont les conséquences de l'expression d'un anticorps transgénique sur le devenir des cellules B ainsi modifiées, quels peuvent être les impacts de la stimulation de la réponse via l'anticorps transgénique sur la réponse endogène et vice versa, s'assurer que cette vaccination par thérapie génique n'altère par la réponse immunitaire propre à

l'hôte. Aucun modèle in vitro ne permet d'étudier la réponse immunitaire dans sa globalité, interaction entre les différents composants du système immunitaire, localisation anatomique des cellules d'intérêt.

Ce projet a été dessiné en 6 procédures, le nombre de souris utilisé dans chacune des procédures sera réduit à son minimum sans pour autant compromettre les objectifs du projet ni les interprétations statistiques des résultats. Le nombre maximal d'animaux est estimé à 2300 souris. Les techniques utilisées minimiseront la souffrance animale (utilisations d'anesthésique et d'analgésique). Un suivi adapté des animaux et la définition de points limites précoces et prédictifs de l'apparition d'un mal être permettent de limiter au maximum toute souffrance animale.

9836 L'obésité est une maladie chronique qui se caractérise principalement par un excès de masse grasse (adiposité élevée) se traduisant par un excès de poids (Indice de Masse Corporelle > 30). S'il est établi que de nombreux facteurs génétiques et métaboliques peuvent intervenir dans l'installation de l'obésité, il s'avère qu'elle est principalement la conséquence d'une mauvaise alimentation et d'un mode de vie sédentaire. Elle est à l'origine de multiples complications cardiovasculaires (hypertension artérielle, insuffisance cardiaque), respiratoires, rhumatologiques (arthrose), métaboliques et endocriniennes (maladies dues à des perturbations du métabolisme des lipides, des glucides et de l'insuline), et enfin cancéreuses (cancer de la prostate ou colorectal). Malgré l'intérêt scientifique croissant suscité par ce syndrome, notamment en raison du problème majeur de santé publique qu'il soulève, ses mécanismes physiopathologiques ne sont pas élucidés, et sa définition comme ses critères diagnostiques encore non harmonisés. De nombreuses études suggèrent cependant que le syndrome métabolique serait associé à un certain nombre de marqueurs qui peuvent être mesurés dans le sang et/ou les tissus (foie, muscle, tissu adipeux). Le but de nos travaux sera de rechercher des marqueurs de la sensibilité à l'obésité induits par différents types de régime (standard, lipidique, gras-sucré) sur un modèle de souris (C57BL/6) très utilisé pour les recherches dans le domaine de la nutrition et reconnu pour présenter comme l'Homme, une grande variabilité des individus à l'obésité.

Nous utiliserons 3 types de régimes : un régime d'entretien standard, un régime hyper lipidique (HL) et un régime glucido-lipidique ou western diet (W). Les mécanismes à l'origine de l'obésité n'étant pas identiques chez les mâles et les femelles du fait du contexte hormonal et d'une distribution différente des masses grasses, cette étude sera réalisée sur les deux sexes. Elle évaluera sur une période de 3 ans les effets de ces trois régimes sur le poids, la composition corporelle, la prise alimentaire et la résistance à l'insuline. Chaque régime sera étudié pendant 12 semaines sur 60 individus mâles et femelles (360 souris au total) car les comparaisons statistiques ne pourront s'effectuer que sur environ la moitié des souris. Sur la base de nos travaux précédents, nous pouvons anticiper qu'environ 25% des souris (15 souris) seront franchement sensibles au régime et réciproquement seules 25% des souris (15 souris) y seront franchement résistantes. Les souris seront âgées de 8 semaines en début d'étude et les régimes donnés à partir de l'âge de 10 semaines. Cette fenêtre correspond à la période à laquelle se fait normalement ce type d'étude. Les variations importantes de poids et de composition corporelle induites par les différents régimes alimentaires utilisés dans l'étude permettront d'établir un modèle prédictif robuste et de mieux normaliser les résultats des études faites chez la souris dans différentes conditions expérimentales. Les 180 souris dites « intermédiaires, ni sensibles ni résistantes » seront exclues de l'étude après trois semaines de régime, temps nécessaire et suffisant pour repérer les souris sensibles et résistantes aux régimes. Ces 180 souris seront introduites dans une étude menée en parallèle qui aura pour but d'établir une équation prédictive de la dépense énergétique au repos en fonction du sexe, du poids et de la composition corporelle des souris. Ce deuxième protocole nous permettra d'optimiser l'utilisation de ces animaux et ainsi de respecter au mieux la règle des 3R.

Ce projet s'inscrivant dans le cadre d'études précliniques visant à établir des recommandations nutritionnelles par l'étude d'adaptations comportementales et la mesure de conséquences au niveau de l'équilibre énergétique de l'individu entier, les objectifs du projet ne peuvent être atteints sans recours à un animal modèle de l'Homme.

Afin d'identifier les marqueurs précoces de l'obésité, (niveau d'insuline plasmatique, les enzymes hépatiques, la protéine C réactive, les lipoprotéines, les marqueurs de l'inflammation cellulaire),

nous réaliserons une biopsie du tissu adipeux avant de soumettre les animaux aux différents régimes. Ces prélèvements nous permettront d'étudier l'expression des gènes impliqués dans le contrôle du métabolisme des glucides et des lipides. Nous réaliserons des tests de tolérance au glucose à mi-parcours (6 semaines de régime) et à la fin (12 semaines de régime) de chaque étude sur les souris sensibles et résistantes. Sur les souris intermédiaires, la dépense énergétique sera mesurée par une méthode non invasive (mesure des échanges respiratoires) après 6 et 24 semaines de régime afin d'étudier des animaux de poids et de composition corporelle très différents. A la fin des expérimentations, les animaux seront tous euthanasiés, le sang et différents organes seront prélevés afin d'identifier de nouveaux marqueurs et d'analyser les répercussions des régimes sur les souris sensibles ou résistantes et de déterminer les relations entre composition corporelle et dépense énergétique sur les souris intermédiaires.

Nous avons inclus 60 souris par régime et par sexe sur la base des données de la littérature et de nos expériences passées qui indiquent qu'il faut pouvoir disposer de 15 sujets par groupe pour garantir des résultats statistiques fiables. Les souris seront hébergées en cages individuelles car il faudra mesurer la prise alimentaire. Les trois régimes offerts sont appétants et n'induisent ni stress ni malaise aux animaux. Certaines des procédures utilisées au cours de cette étude induisent un stress modéré : le logement en cages individuelles (afin de pallier cet isolement les cages ont des parois transparentes et le milieu est enrichi au moyen de maisonnette), biopsie du tissu adipeux (ces biopsies seront réalisées sous anesthésie et un traitement analgésique est prévu afin de limiter la douleur) et les tests de tolérance au glucose. Afin de limiter le stress et la douleur ces procédures seront réalisées par des opérateurs expérimentés. Le protocole prévoit également la mesure du poids et de la prise alimentaire des souris trois fois par semaine, ce qui permet aux expérimentateurs de suivre l'évolution de l'état sanitaire des souris.

9837 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 causer 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'objectif de ce projet est d'identifier et de mieux comprendre les mécanismes moléculaires régulant l'inflammation afin de pouvoir les cibler dans de nouvelles approches thérapeutiques.

L'identification et la caractérisation des mécanismes moléculaires régulant l'inflammation déboucheront sur l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques anti-inflammatoires pour lutter contre les pathologies sus-citées. Afin de limiter le recours au modèle animal, nous menons nos expériences in vitro en utilisant des macrophages péritonéaux de souris. Après injection en intrapéritonéale de thioglycolate, nous recueillons de façon post-mortem environ 30 millions de macrophages par souris, ce qui nous permet de tester de nombreuses conditions expérimentales en utilisant un minimum de souris. Nous avons déterminé que 260 souris maximum serait nécessaire pour mener ce projet à son terme.

Le nombre d'animaux utilisé est le minimum requis pour obtenir des résultats statistiquement interprétables et atteindre l'objectif scientifique du projet. Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des expérimentations ont été mis au point avec des points limites suffisamment prédictifs pour respecter les exigences de remplacement, réduction et raffinement et ainsi permettre une interprétation fiable des résultats dans le respect du bien-être animal, les études dans des lignées établies de macrophages (dérive clonale, différenciation et maturation différentes) ne nous permettant pas de reproduire les mécanismes de l'inflammation.

9838 Les cellules immunitaires Natural Killer (NK) appartiennent à la première ligne de défense du corps contre les agents pathogènes. En effet, ces cellules sont capables de reconnaître et d'éliminer les cellules infectées par un virus mais également les cellules cancéreuses. Elles possèdent un attirail de récepteurs à leur surface leur permettant de reconnaître ces cellules malades. Cependant, en cas de sur-stimulation, les cellules NK vont devenir tolérantes et ne pourront plus exercer leur

fonction. Ce phénomène a été observé lors de maladies chroniques (infection par le virus de l'immunodéficience humaine, hépatites, cancer.) mais les mécanismes entraînant la tolérance également nommée « épuisement » ne sont pas caractérisés. 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. Nous avons démontré qu'une enzyme ayant un rôle central dans le fonctionnement cellulaire, est également impliquée dans la capacité des NK à réagir. Nous pensons qu'une diminution d'activité de cette enzyme, suite à la sur-stimulation par les cellules infectées ou tumorales, pourrait être la cause du dysfonctionnement des cellules NK. Ce projet se propose de reproduire in vivo chez la souris l'induction de l'épuisement des cellules NK en contexte tumoral via l'utilisation de différents modèles tumoraux que nous souhaitons développer et mettre au point. 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 de souris nécessaires a été calculé de façon à apporter des réponses statistiquement fiables tout en évitant des mises à mort inutiles. Pratiquement, nous injecterons différentes concentrations de cellules tumorales modifiées pour inhiber ou activer les cellules NK, dans la veine de la queue ou en sous-cutané, et nous suivrons le développement des tumeurs, leur comportement chez l'animal et l'épuisement des NK. Afin d'optimiser le nombre d'animaux utilisés (742), des techniques de pointe permettant la mesure précise de l'activation des voies de signalisation dans les cellules (cytométrie en flux multiparamétrique, cytométrie d'image) 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 limites au-delà desquels les animaux seront mis à mort.

9839 Le diplôme de Licence ou de Master Sciences de la Vie est délivré suite à un enseignement théorique et pratique en lien avec l'étude des grandes fonctions physiologiques chez le mammifère et chez l'homme. Parmi les objectifs au-delà de l'acquisition de connaissances et de compétences propres à une formation scientifique initiale, la poursuite des études 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 nécessite des apprentissages en lien avec les problématiques de ces laboratoires. La mise en place de protocoles, la maîtrise de l'acquisition des signaux biologiques et leurs analyses poussées sont nécessaires. En conséquence, l'enregistrement de paramètres biologiques sur le rat vigile est primordial pour sensibiliser et instruire les étudiants aux pratiques des études précliniques obligatoires dans le développement d'une nouvelle molécule candidat médicament. Les maquettes pour ces parcours sont validées depuis Juin 2017 par les tutelles compétentes.

Afin d'atteindre ces objectifs de formations méthodologique et pratique, les études sont réalisées sur plusieurs séances. Les différentes séances permettent aux étudiants d'être initiés à la manipulation, la contention des animaux, aux techniques de pléthysmographie et Tail-Cuff permettant de mesurer les fonctions physiologiques respiratoire et cardiovasculaire de manière non invasives sur le rat vigile.

Dans un second temps, les étudiants sont amenés à mettre en place des protocoles afin de maîtriser l'acquisition et l'analyse de ces mesures.

Nous utiliserons au maximum 250 rats soit 50 rats par année universitaire sur la durée de ce projet. La « Règle des 3 R » établie par Russel et Burch a été considérée.

(Remplacer) Compte tenu des objectifs de la formation, il ne nous est pas possible de remplacer l'expérimentation animale par d'autres alternatives in vitro.

(Réduire) La réduction du nombre d'animaux a été prise en compte en répartissant les étudiants par groupe de 4 ou 5 afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés avec un animal par groupe d'étudiants et les données recueillies sont également partagées entre les groupes. Ce nombre est un minimum nécessaire pour répondre aux exigences de la formation en termes

d'observation et de pratique technique en accord avec les obligations pédagogiques relatives au diplôme et pour satisfaire au critère de réduction du nombre des animaux en vigueur dans la règle des 3R. Les animaux sont réutilisés sur plusieurs séances après un délai minimum de 3 jours.

(Raffiner) Le raffinement a été pris en compte en réduisant le stress induit par les manipulations en conditionnant les animaux en amont au dispositif de contention ou de mesure de la respiration. De plus, les données recueillies lors de la précédente maquette d'enseignement ont été utilisées pour affiner au mieux les procédures expérimentales notamment pour la définition de points de contrôle et limites (comportementaux et physiques).

9840 La communication entre l'intestin et le cerveau a été depuis longtemps reconnue et cela a conduit à ce que l'intestin soit surnommé le « second cerveau ». Le rôle du microbiote intestinal dans la signalisation intestin-cerveau est notamment mis en évidence par la présence simultanée de maladies liées au système nerveux central (schizophrénie, autisme, dépression...) et de troubles de type gastro-intestinaux.

Le tryptophane est l'un des 9 acides aminés essentiels à l'homme qui est fourni soit par l'alimentation soit par les bactéries intestinales. Il est nécessaire à la biosynthèse de certaines protéines et est également le précurseur de métabolites incluant des agents neuro-actifs tels que la sérotonine. La sérotonine est présente non seulement au niveau du système digestif mais également au niveau cérébral. Ce neurotransmetteur joue un rôle primordial dans différentes fonctions physiologiques des mammifères. Dans le tractus gastro-intestinal, le métabolisme du tryptophane peut suivre 3 voies principales qui sont toutes sous le contrôle du microbiote intestinal et il a été montré que plusieurs maladies impliquant directement le microbiote intestinal étaient aussi impactées par des métabolites du tryptophane. De plus, les métabolites du tryptophane jouent également un rôle clé dans la régulation du système immunitaire. La dérégulation du métabolisme du tryptophane en fonction du microbiote intestinal pourrait donc directement moduler l'activité de différentes zones cérébrales.

L'objectif de ce projet est d'évaluer par imagerie de Tomographie par Emission de Positron, l'impact du microbiote associé à la dérégulation du métabolisme du tryptophane sur le métabolisme cérébral basal ainsi que sur la neuroinflammation cérébrale.

Au total : 108 souris seront utilisées pour ce projet : Le groupe témoin sera constitué de 12 souris (microbiote non modifié), 12 souris par souche (8 souches). Ces 108 souris seront utilisées sur 5 ans.

Remplacement : Ce type d'étude ne peut être substitué par une méthode alternative in vitro ou sur cellules. Il s'agit d'étudier les effets de la modification du microbiote (via la dérégulation du métabolisme du tryptophane) directement sur le cerveau ce qui ne peut être réalisé qu'in vivo.

Raffinement : Les animaux seront hébergés collectivement avec présence d'un enrichissement (tunnel et feuille de sopalin). Toutes les stratégies d'analgésie, d'anesthésie et de soins seront mises en œuvre pour réduire au maximum tout inconfort qui pourrait être induit par le modèle.

Réduction : Le nombre de 108 souris correspond à l'effectif minimum (témoins inclus) pour pouvoir réaliser les tests statistiques. L'imagerie nous permettra de répondre à 2 questions : état basal du métabolisme cérébral en fonction du microbiote et présence ou non de neuroinflammation. Sans l'imagerie le nombre d'animaux serait multiplié par 2.

9841 Les cellules NKT sont des lymphocytes impliqués dans les réponses immunitaires contre les tumeurs, les virus et certaines bactéries. Ils se développent dans le thymus et migrent ensuite dans le foie à l'état mature. On ne connaît encore pas bien les détails moléculaires du développement des cellules NKT, mais des résultats récents ont montré l'implication du facteur de transcription Zeb1. Nous voudrions savoir si ce facteur essentiel au développement des NKT est sous l'influence du TGFb une cytokine également essentielle aux cellules NKT. Ce projet vise à tester le lien entre TGFb et Zeb1 dans le développement NKT en mesurant l'expression de Zeb1 dans les cellules NKT suite à un traitement in vivo avec du TGFb ou un anticorps qui bloque le TGFb endogène. Des résultats précédents suggèrent un lien entre Zeb1 et TGFb in vitro mais il faut maintenant confirmer ce lien in vivo. Le but de ce protocole est de tester ce lien dans un modèle de souris. A la fin des

traitements qui seront administrés aux souris, celles-ci seront mises à mort et plusieurs organes seront collectés pour étudier l'expression de zeb1 (thymus, rate, foie).

Les protocoles présentés répondent à la règle des 3R (réduire raffiner et remplacer). Le nombre de souris a été calculé afin que les résultats aient une valeur statistique malgré les variations entre les animaux. Le nombre de souris sera de 150 sur 3 ans. Tout au long du projet nous veillerons à ce que les conditions d'élevage, d'hébergement et de soin soient les plus adaptés. La souffrance et l'angoisse des animaux seront réduites au maximum.

9842 Le développement de nouveaux traitements de type Host Directed Therapy (HDT) visant à manipuler directement le système immunitaire de l'hôte afin de lui permettre d'éliminer une tumeur ou une infection aiguë ou chronique est en plein essor. Ce type de traitement ne cible pas un pathogène ou un type de tumeurs en particulier mais un ou des mécanismes immunitaires, métaboliques, cellulaires de l'hôte qui peuvent être communs à différentes infections ou différentes tumeurs, qu'ils soient inhibiteurs ou activateurs de la réponse immune. Ces nouvelles thérapies comprennent entre autres le développement de protéines recombinantes (anticorps ou cytokines), de stimulateurs non spécifiques de l'immunité innée (par exemple de type agonistes de TLR), de petites molécules visant à interférer avec le métabolisme cellulaire par exemple.

Notre laboratoire s'intéresse actuellement à ces nouvelles thérapies, notamment dans le cadre du sepsis dont l'origine peut être bactérienne, virale et/ou fongique et dans le but de rétablir la fonctionnalité du système immunitaire dans la phase d'immunosuppression post-sepsis telle qu'elle est décrite chez les patients. Notre savoir-faire repose sur la vectorisation virale et nous souhaitons démontrer l'intérêt de l'utilisation de vecteurs viraux comme carriers de molécules HDT. Pour ce faire, dans des études précliniques chez la souris, des vecteurs viraux carriers de molécules HDT seront évalués et comparés à des molécules HDT basées sur des protéines recombinantes. Le but est de comparer la pharmacocinétique de ces molécules portées par un vecteur viral à celle des protéines recombinantes, d'évaluer l'impact de la voie d'administration et de la dose sur cette pharmacocinétique et leurs effets biologiques au niveau de l'organisme.

Bien que le modèle murin ne reproduise pas complètement la complexité des mécanismes immunitaires chez l'homme, il reste néanmoins une bonne alternative. Il permet en effet d'évaluer in vivo la pharmacocinétique de molécules, leur distribution en fonction de la voie d'administration et d'évaluer leur activité biologique notamment sur les cellules du système immunitaire à l'échelle d'un organisme complet.

A l'heure actuelle, aucun modèle in vitro ne peut se substituer au modèle murin pour notre étude. 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 (utilisation d'un anesthésique local pour les prélèvements). Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet sera réduit au minimum sans compromettre les objectifs de ce dernier : pour la pharmacocinétique, les animaux seront utilisés pour différents temps de prélèvements tout en respectant l'intervalle minimum requis entre 2 prélèvements successifs.

Ce projet inclura un minimum de 588 souris et un maximum de 1116 souris.

9843 Environ 95 % des sujets adultes ont été infectés par EBV (Epstein-Barr virus), la plupart du temps sans développer de symptôme.

Cependant, dans certaines régions du monde, l'infection EBV est associée au développement de lymphome de Burkitt (EBL). Chez certaines populations dites à risque, des facteurs environnementaux augmentent le risque de développer des EBL (par exemple, exposition aux parasites de la Malaria ou à des aliments contaminés par une toxine de champignon, la mycotoxine aflatoxine B1 (AFB1)).

Des études menées in vitro et in vivo ont confirmé l'effet combiné de l'association EBV/AFB1 dans l'augmentation du risque de développer des EBL. Par ailleurs, il a été démontré que la protéine id22 réduit la réponse immunitaire et anticancéreuse de l'hôte.

L'objectif de ce projet est de comprendre le rôle de cette protéine dans le développement de lymphome, en association avec les infections par EBV et l'exposition à l'AFB1. Si cette étude valide l'hypothèse de l'interaction étroite entre la protéine id22, l'AFB1 et leurs contributions malignes dans

le développement de lymphome EBV associé, la protéine id22 sera une bonne candidate de traitement.

Aucun modèle in vitro ne permet d'étudier la complexité du système immunitaire et les interactions avec des infections par le virus EBV, la souris est donc le seul modèle pertinent pour cette étude. Ce projet a été dessiné en 3 procédures, le nombre de souris utilisé dans chacune des procédures sera réduit à son minimum sans pour autant compromettre les objectifs du projet ni les interprétations statistiques des résultats. Le nombre maximal d'animaux est estimé à 198 souris. Les techniques utilisées minimiseront la souffrance animale (utilisations d'anesthésique et d'analgésique). Un suivi adapté des animaux et la définition de points limites précoces et prédictifs de l'apparition d'un mal-être permettent de limiter au maximum toute souffrance animale.

9844 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 inflammation chronique intestinale induite par l'hypersensibilité du colon à l'alimentation et au microbiote intestinal.

Il a été montré que HP1 est une protéine régulatrice de l'expression des gènes de l'inflammation. Cette protéine exprimée dans les cellules intestinales a une activité anti-inflammatoire et favorise la croissance cellulaire in vitro. Dans ce contexte, l'objectif est de déterminer in vivo le rôle protecteur de cette protéine dans le contrôle de l'inflammation intestinale et de la réparation tissulaire.

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.

Dans un premier temps nous traiterons toutes les souris pour invalider spécifiquement notre gène d'intérêt soit dans l'ensemble du compartiment épithélial intestinal soit spécifiquement dans la cellule souche intestinale. Ensuite les souris subiront 2 procédures pour induire une réponse inflammatoire (stress par irradiation et colite au dextran sulfate) qui nous permettra de procéder à l'étude du contrôle de la réaction inflammatoire et de la régénération tissulaire.

Le nombre de souris utilisées sera de 376. Pour respecter le principe des 3R, leur nombre sera réduit au minimum : analyses de paramètre multiples pour chaque souris et utilisation de tests statistiques adaptés. De plus, nous avons réduit le nombre d'animaux nécessaires à cette étude en développant un modèle de « mini-colon », produit à partir de cellules souches intestinales de souris prélevées en post-mortem, permettant des analyses in vitro. Pour leur bien-être, les souris seront hébergées en groupe, avec une litière appropriée et des matériaux de nidification (coton et maisons en carton).

Nous savons que ces modèles d'inflammation chronique intestinale sont susceptibles de provoquer des diarrhées aux souris. Si une diarrhée persiste plus de 2 jours, nous leur administrerons une solution isotonique pour éviter la déshydratation. En ce qui concerne la douleur, nous ne pourrions pas injecter d'antalgique ou d'anti-inflammatoire qui risquent d'interférer avec nos résultats sur la réponse inflammatoire, toutefois les souris seront sous surveillance journalière et des points limites ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire.

Le bénéfice attendu du projet est une meilleure compréhension des mécanismes déclencheurs des maladies chroniques intestinales et l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

9845 Dans le cadre de la procédure de libération européenne, la mise sur le marché de lots de vaccins antidiptériques nécessite un contrôle de l'activité biologique selon les référentiels réglementaires en vigueur. Les protocoles expérimentaux appliqués et les spécifications relatives à la qualité de ces vaccins sont décrits dans les monographies de la Pharmacopée européenne et les rapports techniques de l'OMS. Ces méthodes 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, administration, ...) ce qui permet de réduire le nombre d'animaux utilisés en expérimentation animale pour vérifier l'efficacité de ces vaccins. Par ailleurs, dans la mesure du

possible, nous nous efforçons de regrouper les analyses de produits afin de réduire le nombre de cobayes utilisés. Les cobayes sont hébergés dans des cages enrichies de tubes PVC leur servant de cachette. La nourriture et l'eau de boisson sont contrôlés et disponible ad libitum. Les animaux sont surveillés quotidiennement et des points limites sont prédéfinis. Le nombre d'animaux nécessaires pour la libération des lots de vaccins est de 1540 cobayes/an et 7700 cobayes sur 5 ans. L'efficacité des vaccins dépend de la réponse immunitaire de l'organisme. Cette réponse ne peut être étudiée sur cellules isolées.

- 9846** 1-Objectif scientifique du projet : La tularémie est une maladie infectieuse provoquée par *Francisella tularensis*, une bactérie intracellulaire. Elle provoque une inflammation importante. Les médiateurs de l'inflammation peuvent être de nature lipidique et ce projet a pour but de caractériser si ceux-ci sont impliqués dans la défense de l'hôte contre *Francisella*. Des souris sauvages ou déficientes pour des voies précises de l'immunité innée seront infectées par la bactérie et ce afin d'observer les paramètres d'infection et de réponses dans les 2 modèles et donc d'étudier la fonction précise des médiateurs lipidiques dans la réponse de l'hôte à *Francisella tularensis*.
- 2- Retombées attendues : Ce projet devrait nous permettre de mieux caractériser la synthèse de médiateurs lipidiques induite lors d'une infection par *Francisella*, et comment ces médiateurs lipidiques affectent ensuite la réponse immunitaire de l'hôte. Une meilleure compréhension de ce système *Francisella*-immunité-médiateurs lipidiques devrait aider au développement de nouveaux médicaments impliqués dans la réponse immunitaire chez l'hôte.
- 3- Conformité avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement : Ce projet est en conformation avec les 3Rs car les questions posées ici nécessitent un système complexe, et ne peuvent pas être investiguées dans des modèles *in vitro* ou dans des modèles *in vivo* utilisant des animaux invertébrés. Une étude pilote sera réalisée pour réduire au maximum le nombre d'animaux requis. De nombreux paramètres de l'hôte et de la bactérie seront étudiés sur chaque animal pour réduire au maximum le nombre de répétitions expérimentales. Une étude bibliographique a été réalisée pour utiliser les doses les plus adéquates de pathogènes, ainsi que d'inhibiteurs ou de médiateurs de l'inflammation au cours des expériences. Les animaux seront surveillés tous les jours avec des points limites parfaitement définis. La souche bactérienne utilisée est très bien caractérisée et les expériences ne dureront pas plus de 48h, ce qui correspond à la phase précoce de l'infection, connue pour être moins agressive.
- 4- Nombre total d'animaux inclus dans ce projet : 268 souris au maximum.

- 9847** De nombreux cancers développent une résistance à la chimiothérapie souvent responsable de récurrences et de métastases. Ce phénomène est un vrai problème de santé publique. C'est notamment le cas pour le cancer de la glande surrénale (surrénalome), qui est un cancer rare de mauvais pronostic. Le traitement actuellement prescrit aux patients est très peu efficace et présente de nombreux effets secondaires. Il y a donc urgence à trouver de nouvelles pistes thérapeutiques pour traiter ce cancer.

Nous avons découvert que la protéine Patched fait sortir certains agents thérapeutiques des cellules cancéreuses et leur confère la capacité de résister au traitement. Cette protéine est exprimée dans de très nombreux cancers agressifs, et notamment dans le surrénalome. Nous avons montré qu'une petite molécule chimique est capable d'inhiber l'activité de Patched et d'améliorer l'efficacité de la chimiothérapie vis-à-vis des cellules de surrénalome en culture. Nous avons déjà vérifié l'absence de toxicité de cette molécule sur le développement de l'embryon de poulet et chez la souris adulte. Nous avons également de premiers résultats montrant qu'elle accroît l'efficacité de la chimiothérapie sur la croissance tumorale chez la souris.

Les surrénalomes sont le plus souvent mortels lorsqu'ils sont métastatiques, c'est à dire que les cellules cancéreuses sont disséminées dans divers organes. Il est donc crucial d'évaluer si l'inhibiteur de Patched peut aussi s'avérer efficace à ce stade de la maladie. Pour cela, nous utiliserons le seul modèle existant de surrénalome métastatique. Il repose sur l'injection de cellules de surrénalome métastatiques humaines dans la rate de souris immunodéficientes, ce qui permet l'obtention de métastases hépatiques dans $\approx 90\%$ des animaux. Pour cela nous effectuerons la chirurgie sous anesthésie générale avec administration d'antidouleur. Nous évaluerons le

développement des métastases et la réponse aux traitements par imagerie optique réalisées à 15 jours et 30 jours après l'injection des cellules tumorales. A la fin du traitement, nous analyserons les foies afin de quantifier la charge tumorale métastatique et comparer l'efficacité des traitements. Nous évaluerons la capacité de l'inhibiteur de la protéine Patched à augmenter l'efficacité de la chimiothérapie pour lutter contre le développement des métastases. Pour cela, il est nécessaire de comparer 4 groupes de traitement avec 24 souris par groupe, soit 96 souris au total.

Pour respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux utilisés sera réduit au minimum. Lors des procédures une surveillance journalière sera mise en place afin de réduire au maximum la souffrance et l'anxiété des animaux (anesthésie, analgésiques et antibiotiques seront administrés afin de soulager la douleur et d'éviter d'éventuelles infections post-chirurgicales). Pour chaque procédure des points limites ont été établis, entraînant l'exclusion de l'animal du protocole et sa mise à mort anticipée. Durant l'ensemble de ces procédures, afin de réduire le stress et d'améliorer le cadre de vie des animaux, nous optimiserons les conditions d'hébergement des animaux : portoirs de cages ventilés et tempérés ; présence d'enrichissement dans les cages (coton de nidation et/ou maisonnettes) ; maintien des animaux en groupes de 4 à 6 afin d'éviter le stress de l'isolement.

Ces études seront essentielles pour prouver l'efficacité thérapeutique de cette nouvelle molécule et ouvrir la route à de nouveaux traitements cliniques du surrénalome métastatique.

9848 Les reins sont des organes essentiels qui exercent de multiples fonctions. Ils agissent comme des filtres et éliminent les déchets produits par l'organisme, ils maintiennent l'équilibre hydro-électrolytique et acido-basique du corps et produisent aussi des hormones, des vitamines et des enzymes. Pour s'acquitter de ces diverses et importantes fonctions le rein possède une structure complexe bien particulière qu'il acquiert au cours du développement de l'embryon. En conséquence un développement correct des reins est crucial pour assurer ces fonctions, et des défauts dans ce processus sont associés à des insuffisances rénales chez les enfants. En outre, la diminution du nombre d'unités de filtration du rein (les néphrons), dont le nombre est établie lors de la formation des reins, est associée à un risque accru de développer une hypertension. Pour ces raisons l'étude du développement du rein est importante, elle permet de comprendre l'apparition de certaines maladies rénales. Dans notre laboratoire nous nous intéressons à la fonction des gènes de la famille des Rspodin. Quand ils sont activés ces gènes conduisent à la production de protéines qui sont secrétées. Dans l'intestin, l'estomac, les ovaires ou le cœur les protéines RSPONDIN activent des voies moléculaires importantes pour le bon fonctionnement des cellules et la fonction de ces organes. Nous avons montré que les gènes Rspodin sont activés au cours du développement des reins dans les cellules souches rénales qui vont contribuer à la formation des néphrons. Dans ce présent projet nous voulons poursuivre cette étude et déterminer quelle est la fonction de ces gènes ; A quel(s) stade(s) du développement et dans quelle structure du rein est-ce qu'ils agissent ? Quel(s) est ou sont leur(s) action(s) sur les cellules chez lesquelles ils sont activés ? Est-ce que des mutations dans ces gènes sont associées à des pathologies chez l'homme ? Pour cette étude nous utiliserons des modèles de souris génétiquement modifiées afin d'inactiver ces gènes au cours de la formation des reins. Ces expériences nous permettront de déterminer la fonction des Rspodin, et d'extrapoler ces analyses à la formation du rein humain et aux processus d'apparition de pathologies. Comme ces gènes semblent importants pour la formation des reins, et afin d'éviter toute souffrance associée à leur absence, nous limiterons nos analyses chez l'embryon et à un stade périnatal (Raffinement). De plus nous utiliserons un système de délétion de gènes inductible que nous pourrions contrôler dans le temps et restreindre à certaines cellules rénales (Raffinement). Dans une perspective de réduire le nombre de souris, nous utiliserons un nombre minimal d'animaux qui sera malgré tout suffisant pour nous permettre d'obtenir des résultats qui seront statistiquement significatifs. De plus nous regrouperons nos expérimentations sur les échantillons prélevés (Réduction). Finalement, pour éviter de réaliser des expériences de génétique complexes qui nous obligeraient à élever un grand nombre de souris nous avons choisi de faire à la place des expériences in vitro avec des reins embryonnaires mis en culture (Remplacement).

Pour ce projet nous utiliserons un nombre total de 585 animaux.

9849 Ce projet est dédié à l'étude des stades post-larvaires de poissons côtiers méditerranéens lors de leur phase d'installation sur le littoral, qui constitue une étape déterminante dans le renouvellement des stocks de poissons. Le stade post-larvaire est une étape décisive du cycle de vie des poissons côtiers car c'est une phase intermédiaire entre les jeunes larves pélagiques, issues de l'éclosion des œufs en pleine mer et les juvéniles benthiques, qui une fois installés sur les habitats côtiers deviennent sédentaires. Il se base essentiellement sur un constat (établi principalement en milieu tropical), que ces jeunes stades de poissons possèdent des capacités physiques et comportementales, c'est-à-dire qu'ils seraient capables de « choisir » leur lieu d'installation, et ne sont pas simplement soumis aux aléas des courants marins.

Ce projet a pour but de recueillir des informations sur les capacités de nage de plusieurs espèces au stade post-larvaire et de définir les durées de migrations des jeunes individus du large vers la côte. Ces informations pourront implémenter de futurs projets de modélisation des trajets d'individus au stade larvaire, objectif déterminant pour la gestion et la protection des habitats côtiers et des ressources halieutiques. En effet, ces connaissances pourront à l'avenir fournir des éléments d'aide à la gestion pour l'identification d'habitats côtiers préférentiels qui peuvent être susceptibles d'abriter des poissons juvéniles, très vulnérables à ce stade de vie.

Pour atteindre ces objectifs, plusieurs actions sont envisagées. Dans un premier temps, la capture des individus sera organisée sur le littoral nord-oriental de notre zone géographique en suivant des calendriers d'arrivées des espèces. Les prélèvements se feront à l'aide d'un engin de pêche non destructif dédié spécifiquement à la capture de jeunes stades de poissons le CARE (« Collect by Artificial-Reef Eco-friendly »). Les pêches seront réalisées (pose des pièges lumineux de nuit avec autorisation) jusqu'à l'atteinte d'un quota de 30 individus (échantillons) par espèces (lot) (quantité minimale établie pour des moyennes statistiques par espèce). Les espèces visées sont : l'apogon, le sar commun, le mullet, l'oblade, la dorade grise, le picarel, la saupe et le pageot (8 espèces x 30 individus = 240 individus au maximum selon les succès de pêche). Les prélèvements seront vérifiés (dans des bacs appropriés) sur place (à la relève des pièges). Les prélèvements superficiels (espèces non visées et individus supplémentaires) seront relâchés directement. Une fois les échantillons recueillis, ils seront transportés directement au laboratoire dans des bocaux de 10L (température ambiante). Au laboratoire, les individus seront transférés dans des aquariums d'acclimatation de 100L à renouvellement constant (eau de mer à température ambiante identique à celle du milieu naturel). Les transferts seront faits de manière douce (pas de contact, pas d'épuisette utilisée). Avant la réalisation de l'expérimentation sur les capacités de nage, un temps d'acclimatation est nécessaire, 5h au minimum pour éviter le stress et avec une phase de nourrissage.

Pour les expérimentations de nage, chaque échantillon sera placé dans un tunnel de nage alimenté en eau de mer (avec un débit connu). L'expérimentation consiste à augmenter progressivement le débit d'eau arrivant (par cran de vitesse de 2 cm/s toute les 5 min) jusqu'à l'observation de premiers signes de fatigue (position non stable dans le tunnel). Le temps de nage et la vitesse du courant supportés par chaque individu permettra de définir les capacités de nage moyenne des espèces testées. Les temps d'expérimentation dépendront donc des capacités des individus (plus ils seront capables de nager contre l'augmentation du courant, plus l'expérimentation sera longue). Après chaque test, les individus seront pris en photo et mesurés. Chaque individu subira un test de nage et une prise de mesure. Nous pourrions ainsi mettre en relations les capacités de nage et la morphologie des échantillons. Toutes les actions ont été pensées avec un raffinement optimal (capture/ transport/ expérimentation/ prise de mesure), c'est-à-dire qu'elles seront réalisées avec le moins de manipulations possibles et avec des transferts réduits au minimum.

Après l'expérimentation et la prise de mesure, les individus devront être euthanasiés par anesthésie en surdose pour la détermination de la période larvaire (durée de migration du large vers la côte) pour chaque espèce. Tous les individus testés seront donc placés, un à un, dans un bac euthanasiant. En effet, il est indispensable de prélever les otolithes des post-larves (pièces calcaires situées dans l'oreille interne des poissons), pour déterminer l'âge des individus et donc estimer leur temps (en jours) de migration pour leur installation sur les habitats côtiers. Enfin, les individus seront conservés congelés pour des analyses ADN ultérieures. Il est nécessaire d'effectuer des

vérifications d'identifications ADN pour assurer les futurs résultats pour une recevabilité scientifique (articles publiables).

Le projet dans sa globalité apportera des connaissances fondamentales sur les espèces testées, qui n'ont encore jamais été recueillies pour certaines espèces méditerranéennes. Il pourra fournir des connaissances déterminantes pour mieux comprendre le fonctionnement et la biologie des jeunes stades de poissons étudiés, qui sont des éléments indispensables pour l'établissement de mesures et d'actions efficaces de protection et de gestion des stocks de poissons côtiers. Connaître et comprendre ces jeunes stades de vie de poissons côtiers constitue un véritable outil pour des mesures de gestion des populations.

9850 Le mélanome cutané est une tumeur maligne qui se développe à partir de cellules de la peau, les mélanocytes. Ces cellules fabriquent la mélanine, un pigment qui donne sa couleur à la peau et qui la protège du soleil. Le mélanome est un cancer fréquent avec plus de 11000 nouveaux cas estimés en 2012 dans le monde. Dans les pays occidentaux, la fréquence du mélanome est multipliée par deux tous les dix ans depuis 50 ans.

Quand la tumeur est de faible épaisseur et qu'elle reste localisée à la peau, la chirurgie est le traitement de référence. Lorsque le mélanome se propage dans les ganglions et devient métastatique, les traitements disponibles sont l'immunothérapie et les thérapies ciblées. L'immunothérapie (IT) est un traitement qui entraîne l'organisme à détruire les cellules tumorales par ses propres défenses immunitaires. Les thérapies ciblées vont, quant à elles, empêcher le fonctionnement de protéines mutées qui favorisent le développement du cancer. Cependant ces traitements ne sont pas toujours efficaces, imposant la poursuite du développement de nouvelles stratégies de traitement.

Notre équipe développe une nouvelle approche de traitement du mélanome métastatique qui utilise la radiothérapie. Dans notre cas, la radioactivité n'est pas apportée par un appareil qui génère les rayons comme dans la radiothérapie classique externe, mais par une molécule, appelée ICF01012, qui contient de l'iode radioactif et qui se fixe spécifiquement sur la mélanine contenue dans le mélanome. Cette molécule peut être administrée sous forme de perfusion intraveineuse. On parle donc de radiothérapie interne vectorisée (RIV). Cette approche a déjà démontré son efficacité via la diminution de la croissance de la tumeur et du nombre de métastases, avec une toxicité acceptable chez des souris porteuses de mélanome.

Nous souhaitons étudier l'impact de la RIV seule et associée à une immunothérapie, sur la réponse immunitaire antitumorale, en utilisant un modèle d'implantation de tumeurs en sous-cutané chez la souris. En effet, il est connu que la radiothérapie externe classique stimule la réponse immunitaire antitumorale. La RIV pourrait déclencher une réponse similaire mais à notre connaissance, il n'y a pas de données à ce sujet dans la littérature pour le mélanome métastatique. Si tel était le cas, la combinaison de la RIV à l'IT (un des traitements actuels du mélanome métastatique) présenterait un intérêt majeur : les effets sur l'immunité de la RIV pourraient accroître considérablement l'efficacité de l'IT.

Dans un premier temps, afin d'évaluer la participation du système immunitaire dans l'efficacité de la radiothérapie interne, nous souhaitons comparer lors d'une étude de survie l'efficacité d'ICF01012 chez des souris immunocompétentes comparée à des souris immunodéficientes (n=78).

Cette première étude servira de feu vert aux études suivantes : si un différentiel de croissance tumorale est mis en évidence, des souris immunocompétentes, porteuses de mélanome, seront traitées avec une IT dans le cadre d'une étude de survie (n=364). Des études mécanistiques permettront d'appréhender les mécanismes mis en jeu dans les réponses observées chez des souris immunocompétentes traitées par la combinaison RIV + IT (n=364).

Le nombre d'animaux inclus dans ce projet a été optimisé conformément à la règle des 3R est de 806 sur 5 années. Ce nombre a été calculé afin de garantir une valeur statistique à l'étude menée. En effet, de nombreuses études in vitro réalisées en amont ont permis de remplacer l'utilisation des animaux. Cependant, ces études sur cellules ne peuvent pas se substituer aux études sur un organisme entier afin d'évaluer les effets potentiellement indésirables sur d'autres organes d'une nouvelle thérapie.

Au cours de ce projet, le nombre d'animaux nécessaire est réduit au maximum en sélectionnant uniquement les expérimentations essentielles. La surveillance quotidienne des animaux permettra de déceler les premiers signaux de stress, de douleurs ou d'inconfort pour l'animal qui pourront être améliorés par l'administration d'antalgiques avant l'atteinte des points limites définis. Les conditions d'hébergement seront optimisées (portoirs ventilés, température, hygrométrie, luminosité, densité animale, enrichissement de milieu avec coton pour la nidification, bâtonnet de bois pour ronger et cabane de cachette).

9851 L'obésité est un problème majeur de santé publique à l'échelle mondiale, qui affecte actuellement plus de 300 millions de personnes. À ce jour, nous manquons d'options pharmacologiques qui permettraient une prise en charge efficace de la majorité des patients obèses tout en limitant les contraintes et effets secondaires. Afin d'envisager de nouvelles thérapies, il est nécessaire de mieux connaître les phénomènes biologiques qui régulent la prise alimentaire et le poids corporel.

Dans ce contexte, le cerveau est un organe d'une extrême importance car c'est lui qui détermine ce que l'on nomme la « balance énergétique », à savoir l'équilibre entre le stockage et la dépense de calories et par extension le gain ou la perte de poids. Plus précisément, cette régulation cérébrale s'effectue dans une structure située à la base du cerveau : l'hypothalamus. De nos jours, de plus en plus d'études démontrent que notre comportement alimentaire n'est pas simplement régulé par des signaux purement métaboliques, mais que les régions cérébrales impliquées dans le plaisir et la motivation sont également mises en cause. Ainsi, lorsque nous mangeons, les signaux relatifs à la fois au statut énergétique de notre organisme et l'état émotionnel et motivationnel doivent interagir afin de contrôler la prise alimentaire.

Notre projet vise à étudier les interactions anatomiques et fonctionnelles entre l'hypothalamus et les aires cérébrales du plaisir et de la motivation, et à comprendre comment ces circuits cérébraux sont affectés par un régime riche en calories.

Pour ce faire, nous utiliserons différents modèles de souris génétiquement modifiées nous permettant de manipuler spécifiquement l'activité de populations neuronales restreintes dans ces différentes régions cérébrales d'intérêt, et nous caractériserons l'activité neuronale de ces différentes populations grâce à des techniques d'enregistrements électrophysiologiques et le comportement alimentaire. Les données seront obtenues chez des souris soumises, ou non, à un régime riche en calories. Les informations apportées par ce projet nous permettront d'accroître nos connaissances sur la régulation de la prise alimentaire par ces différentes aires cérébrales.

Nous prévoyons d'utiliser un maximum de 1465 souris mâles adultes, car ce projet sera réalisé pendant 5 ans. Nous avons optimisé les protocoles afin de réduire au maximum le nombre de souris utilisées : des tests de puissance statistique ont été employés pour calculer le plus petit nombre d'animaux par groupe nécessaire à l'obtention de résultats statistiquement exploitables. En plus, ce chiffre comprend le nombre d'animaux utilisés pour des études préliminaires (pilotes), afin de déterminer les doses optimales des composés qui seront testés dans nos expériences et mettre en place de nouvelles techniques, ce qui permettra de diminuer la quantité d'animaux utilisés à long terme. La souris représente un modèle de choix pour notre projet par la possibilité d'étudier des individus génétiquement modifiés et dont la physiologie générale est suffisamment proche de celle de l'être humain pour que les informations obtenues soient pertinentes sur un plan médical. De plus, les mécanismes biologiques que nous étudions impliquent une communication bidirectionnelle entre le cerveau et le reste de l'organisme, que ce soit pour la régulation de l'appétit, de la glycémie (taux de sucre dans le sang) ou encore le stockage de graisse. Ainsi, il est absolument nécessaire d'étudier un organisme entier et aucune méthode *in vitro* ou *in silico* ne peut le remplacer. Enfin, en vue du raffinement des procédures, un soin particulier est apporté aux questions relatives au bien-être animal. Le suivi précis du poids et de la prise alimentaire de chaque souris nécessite un isolement de l'animal. Ainsi, les souris sont hébergées en cages individuelles dans une pièce dédiée, avec régulation de la température, de l'humidité et de la luminosité. Le manque d'interactions sociales est compensé par un enrichissement des cages. En outre, les cages, transparentes, sont rapprochées les unes des autres afin que chaque animal puisse avoir un contact visuel avec ses congénères. Avant les expériences, les animaux sont manipulés fréquemment afin de les habituer aux expérimentateurs et réduire ainsi leur stress. Enfin, pour les procédures

impliquant une neurochirurgie, un protocole d'anesthésie et d'analgésie peri-opératoire est en place afin de garantir la bonne prise en charge de nos animaux.

9852 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 β à insuline et provoquant une glycémie à jeun $>1.26\text{g/l}$ de sucre par litre sang. Cette approche a montré sa faisabilité et son efficacité avec l'obtention de près de 100% d'insulino-indépendance immédiatement après greffe. Néanmoins, une perte importante des cellules greffées est à l'origine de la nécessité de greffer plusieurs fois le même patient avec des cellules provenant de différents donneurs, ce qui dans un contexte de pénurie d'organe, rend difficile la généralisation de cette thérapie. De plus l'implantation a lieu dans la veine porte du foie ce qui génère une réaction inflammatoire intense qui va détruire jusqu'à 40% de la greffe. Enfin, les traitements immunosuppresseurs mis en place sont à termes toxiques pour le greffon. Afin de diminuer la perte du greffon et de maintenir sa fonction à plus long terme, nous étudions la capacité du facteur de pré-implantation (PIF) produit par le fœtus pour se faire accepter de la mère) à moduler l'inflammation et les réactions de rejet dans le site actuellement utilisé en clinique (le foie) et un site alternatif (l'omentum : tissu graisseux abdominal). PIF est une molécule d'intérêt car il a été décrit dans des modèles de transplantation ovarienne chez le babouin comme inducteur de l'immunotolérance et modulateur de réactions inflammatoires.

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

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

9853 Nos recherches visent dans leur ensemble à mieux comprendre les mécanismes neurobiologiques mis en jeu lors de l'apprentissage, la production et la perception de vocalisation chez les oiseaux chanteurs, en étudiant les canaris domestiques et les diamants mandarins. Parce qu'ils apprennent à imiter un chant socialement et qu'ils possèdent des régions cérébrales spécialisées dans ce comportement, ces oiseaux sont un modèle de choix pour l'étude des fondements neurobiologiques du comportement vocal. En effet, hormis l'espèce humaine, ce comportement ne se retrouve que chez certains mammifères marins (cétacés, phoques), ou terrestres (chauve-souris, éléphants) mais est en revanche plus commun chez les oiseaux, en particulier les oiseaux chanteurs, représentant environ la moitié des espèces d'oiseaux recensées dans le monde. Les oiseaux chanteurs possèdent un réseau de structures cérébrales impliquées dans l'apprentissage, la perception et la production du chant. Ils sont actuellement considérés comme un modèle animal d'étude des bases neurales du langage ; leurs vocalisations présentant des points communs avec la parole humaine. Comme les humains, ils apprennent à produire des séries de signaux acoustiques ayant une structure acoustique et une organisation syntaxique.

Le présent projet vise à mieux comprendre le codage neuronal lié à la production, la perception et l'apprentissage du chant. Pour répondre à cette problématique, nous devons multiplier le nombre de neurones enregistrés en un temps donné. Conduire ce type d'expérimentation nécessite le développement d'une méthode d'enregistrement électrophysiologique chronique à l'aide de multi électrodes chez l'oiseau libre de ces mouvements. Cette méthode nous permettra de conduire des

enregistrements de nombreux sites neuronaux en même temps afin d'augmenter fortement la quantité d'information obtenue tout en réduisant le nombre d'individus à utiliser. De plus, pour cette méthode, les oiseaux ont leur propre contrôle, ce qui permet aussi de réduire le nombre d'animaux à utiliser. Nous développerons cette méthode chez deux espèces d'oiseau chanteur, le diamant mandarin et le canari domestique. Ces espèces sont complémentaires : le diamant mandarin apprend un chant simple rapidement, composé d'une séquence stéréotypée unique de notes alors que le canari apprend un chant complexe, composé de séquences variées de notes. Nos objectifs sont de pouvoir conduire des enregistrements électrophysiologiques de longue durée chez ces oiseaux en train de chanter (codage neuronal évoqué) mais aussi chez ces oiseaux endormis (codage neuronal spontané). L'intérêt de ce type de méthode est de pouvoir réduire considérablement le nombre d'individus à utiliser pour nos futures expérimentations notamment puisque nous pourrions exploiter directement la méthode mise au point qui nous permet d'augmenter le nombre de sites d'enregistrements et donc la quantité de données acquises en un temps donné. Dans le cadre du développement de cette méthode, au cœur du présent dossier, nous estimons devoir utiliser au maximum 70 diamants mandarins et 30 canaris. Ces nombres prennent en compte les potentielles difficultés techniques tout en apportant des effectifs suffisants pour répondre aux interrogations scientifiques menées (ici, étude du codage neuronal évoqué et spontané). Si le chiffre de 100 animaux au total paraît important, il est à mettre en relation avec le fait que la méthode que nous développerons sera exploitée pour nos études ultérieures et ainsi réduire le nombre d'individu à utiliser à l'avenir.

Les expérimentations impliqueront, après avoir enregistré le chant des sujets, en une opération chirurgicale au cours de laquelle plusieurs électrodes reliées à un support seront implantées dans le cerveau des oiseaux. Après récupération, nous procéderons à des enregistrements électrophysiologiques lorsque l'oiseau vocalise, écoute son chant ou est au repos voire endormi. Les oiseaux devront être isolés socialement temporairement, pour des raisons techniques, mais aussi dans la mesure où nous nous intéressons à leur comportement de chant que nous enregistrons en plaçant les oiseaux dans des caissons d'isolation acoustique. L'étude du comportement vocal des oiseaux nécessite qu'ils soient dans les meilleures conditions. Les oiseaux seront contrôlés au quotidien afin d'évaluer les niveaux potentiels de douleur et de souffrance. Un antalgique sera administré lors des anesthésies générales et tant que des signes extérieurs de douleur seront observés.

9854 Le carbone-14 (^{14}C) constitue, avec le tritium (^3H), l'un des deux principaux radionucléides rejetés dans les cours d'eau par les Centrales Nucléaires de Production d'Électricité (CNPE). Ils s'accumulent dans les différents composants de l'écosystème aquatique et contribuent majoritairement à la dose annuelle reçue par la population locale, essentiellement par l'ingestion de poissons marqués. Les modèles de prédiction du transfert du ^{14}C entre l'environnement et les poissons restent simples et nécessitent d'être améliorés. En effet, ils n'intègrent pas les différentes formes chimiques du ^{14}C présentes dans l'écosystème et les processus physiologiques modifiant le devenir du carbone le long de la chaîne trophique. De ce manque de connaissances découlent des incertitudes sur les paramètres abiotiques et biotiques régissant le transfert et la distribution du carbone. Le projet a pour objectifs de mieux comprendre le comportement du ^{14}C dans les hydrosystèmes continentaux dans un contexte de rejets des CNPE, et d'étudier le transfert du ^{14}C aux poissons à l'aide d'un modèle apportant davantage de réalisme physiologique dans la description du flux de carbone au sein de la chaîne trophique aquatique. Il s'articule autour de deux axes complémentaires, prenant en compte l'amélioration des modèles de prédiction et l'acquisition de données expérimentales sur le transfert du carbone en conditions contrôlées de laboratoire. A ce jour, il n'existe pas de méthodes alternatives permettant d'acquérir les paramètres nécessaires aux modèles tels que l'efficacité du transfert du ^{14}C chez les poissons, le taux d'élimination et sa distribution dans les différents organes. Il est nécessaire d'utiliser une espèce de poisson, ici l'espèce domestique, *Cyprinus carpio*, présentant une réalité environnementale pour caractériser les transferts des différentes formes du carbone rencontrées dans l'environnement. Les points limités, connus pour cette espèce concernent le suivi du comportement de nage et d'alimentation.

Cette partie du projet conduira à l'utilisation de 420 juvéniles de carpe commune (3-10 cm), achetés en pisciculture. Les poissons seront euthanasiés à l'issue de l'expérimentation. Le degré de sévérité des procédures nécessaires au projet entre dans la catégorie classe légère.

9855 Le but de ce projet est de déterminer la pertinence d'une protéine détectable dans le sang comme biomarqueur pour certains cancers.

Notre laboratoire travaille sur une protéine membranaire d'origine rétrovirale exprimée dans certaines tumeurs et dont l'expression est par ailleurs limitée dans les organes sains. Cette protéine possède également la propriété d'être excrétée dans le sang. Cette caractéristique lui confère donc un intérêt en tant que potentiel biomarqueur tumoral. La détection de biomarqueurs tumoraux constitue un enjeu majeur dans le dépistage des cancers et dans le suivi clinique de la maladie. La recherche de biomarqueurs peut être effectuée grâce à l'utilisation d'un test rapide et spécifique. Ce test est basé sur une réaction de reconnaissance entre des anticorps et des substances étrangères appelées également antigènes. Les anticorps polyclonaux sont des protéines complexes sécrétées par les lymphocytes B en réponse à l'introduction d'un antigène.

Dans notre projet, nous cherchons à produire des anticorps (polyclonaux) dirigés contre la protéine d'intérêt après immunisation de souris. L'antigène d'intérêt sera injecté en présence d'adjuvant afin d'augmenter la réponse immunitaire (comme dans un vaccin). La réponse primaire à cette première stimulation étant généralement de faible intensité, des rappels seront réalisés. Les anticorps contenus dans le sérum de l'animal seront récupérés lors des rappels par prises de sang puis au terme du protocole. Les mesures suivantes seront mises en place pour respecter la règle des 3R. Remplacement : L'immunité humorale correspond à un processus complexe impliquant différents acteurs du système immunitaire in vivo. Ce processus se traduit par la production d'un répertoire diversifié d'immunoglobulines répondant à un grand nombre d'antigènes. In vivo, l'adaptation accrue du système immunitaire vis à vis de l'antigène au fur et à mesure des immunisations est indispensable pour obtenir des anticorps notablement plus spécifiques et pertinents que ceux obtenus avec des systèmes de production in vitro.

Réduction : le nombre d'animaux utilisés sera réduit au maximum (4 lots de 10 souris, soit au maximum 40 souris pour le projet) tout en conservant un nombre suffisant d'individus pour pouvoir tester la réponse immunitaire des souris contre différents fragments de la protéine.

Raffinement : Toutes les procédures seront faites sous anesthésie et les animaux auront un enrichissement en tout temps. Les animaux seront particulièrement suivis pendant les 24h suivant les injections, puis quotidiennement pour examiner leur état de santé. Les prélèvements réalisés, sous anesthésie, concerneront de faibles volumes afin de ne pas induire de souffrance chez l'animal.

Il s'agit d'un protocole de simple vaccinations avec adjuvants.

9856 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. Ces nouveaux protocoles incluent en particulier des protocoles de fractionnement utilisant de fortes doses par fraction, des modifications de débit de dose, de type de rayonnement ou d'énergie, protocoles 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. Ce projet complète et reprend en partie un précédent projet.

Nous exposerons des souris C57BL/6J à deux types de rayonnements X ayant des énergies différentes et des débits de dose différents. Nous exposerons également des souris à différents protocoles de fractionnement. Nous utiliserons un modèle d'irradiation corps entier et un modèle d'irradiation d'une anse grêle extériorisée à 19 Gy en dose unique pour étudier les effets des modifications du débit de dose et de l'énergie du rayonnement, et un modèle d'irradiation thorax entier pour étudier l'effet des modifications du fractionnement, et en particulier de l'utilisation de fortes doses par fraction.

L'irradiation corps entier nous permettra de mettre en évidence si un changement d'énergie ou de débit peut modifier la sévérité des atteintes hématopoïétiques et digestives aiguës après exposition à forte dose. L'irradiation localisée du grêle nous permettra de savoir si le débit du rayonnement influence la sévérité des lésions digestives aiguës et tardives. Enfin, le modèle thorax entier nous permettra de mettre en place différents protocoles de fractionnement et d'étudier leurs effets sur les tissus pulmonaires.

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 ou du débit du rayonnement. Le nombre total de souris utilisées pour ce projet sera de 686. 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. 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, anesthésie et analgésie pour les chirurgies, hébergement en groupe avec enrichissement).

9857 Les maladies lysosomales ont pour origine l'absence ou la mutation d'enzymes ou de protéines membranaires lysosomales qui conduit à des troubles métaboliques et à des dégénérescences tissulaires. Un nouvel acteur qui émerge dans des maladies lysosomales (mucopolysaccharidose IV, la maladie de Niemann Pick type C) est une dérégulation du calcium contenu dans les lysosomes. Notre projet est d'étudier une nouvelle famille de canaux calciques lysosomaux qui pourrait être impliqué dans les pathologies humaines cités plus haut mais également pourraient être impliqués selon des études récentes dans le développement de cardiomyopathie ou de pancréatite. Afin d'explorer les stratégies d'intervention sur les lysosomes, des souris déficientes en ces canaux lysosomaux ont été générées. Ces souris permettent de comprendre le rôle de ces canaux calciques lysosomaux. En effet, ces souris présentent des défauts de sécrétion d'enzymes digestives et des anomalies cardiaques tardives. Ces anomalies pourraient être dues à un déficit de calcium. Nous poursuivons donc notre étude en évaluant la concentration de calcium au cours de l'activité des cellules pancréatiques et des cardiomyocytes chez les souris déficientes pour les canaux étudiés.

Nous avons établi notre projet de recherche en tenant compte de la règle des 3Rs. Ainsi, nous avons mis en place un protocole expérimental permettant de réduire au maximum le nombre de souris nécessaire.

Ainsi, nous avons estimé qu'il nous faudra 1229 souris pour garantir la validité statistique de l'étude réalisée sur trois ans. Un modèle animal est utilisé et nécessaire pour tester et comprendre ces facteurs de risques dans diverses pathologies comme les maladies lysosomiales. A ce jour, il n'existe pas de méthode alternative à l'expérimentation animale pour cette étude selon la référence « the European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing (EURL-ECVAM) ». Dans un souci de raffinement, nous allons veiller au bien-être des animaux qui seront élevés en

milieu enrichi. Il y a du coton pour la gestation et lactation alors que pour les reproducteurs, l'enrichissement est constitué de tunnel et de maison en carton pour les couples. Les animaux sont en milieu enrichis de la naissance à la mort à l'aide de tunnels et de maisons en carton. La procédure d'élevage a été conçue de sorte à supprimer toute souffrance psychique et/ou physique des souris et un point limite a été défini pour les souris. Les animaux sont élevés en fratrie et une évaluation hebdomadaire de la perte de poids, de l'apparence physique et du comportement de l'animal est réalisée.

9858 La maladie d'Alzheimer (MA) est une affection neurodégénérative qui conduit à une altération progressive et irréversible des fonctions cognitives. Au plan cellulaire on peut identifier des dépôts intra- et extracellulaires formés de protéines agrégées et processus inflammatoires. Aujourd'hui, les traitements existants agissent sur les symptômes : ils retardent temporairement la perte des fonctions cognitives associées à la maladie. Depuis plusieurs années, une des voies de recherche menées sur la MA porte sur la prévention des facteurs de risque et sur une intervention sur leurs mécanismes physiopathologiques. Ainsi, le développement de nouveaux modèles mimant davantage les formes sporadiques de la maladie est aujourd'hui une priorité absolue. Ces modèles, en intégrant des facteurs de risque, devraient contribuer à mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques sur lesquels pourraient se fonder des traitements réellement efficaces. Un ensemble de données de la littérature considère le dysfonctionnement thyroïdien comme un facteur de risque de la MA. Dans ce contexte, nous avons récemment mis en évidence qu'une hypothyroïdie chez le rat génère des altérations cellulaires et mnésiques comparables à celles observées lors de la mise en place de la pathologie. Ces résultats associent pour la première fois, dans un seul modèle expérimental, une hypothyroïdie et la modification de plusieurs marqueurs de lésions précoces de la MA. Notre projet vise à renforcer notre étude concernant l'implication des hormones thyroïdiennes dans l'étiologie de la MA : nous allons ainsi tester le potentiel de réversion des hormones thyroïdiennes sur les altérations fonctionnelles et cellulaires associées à l'hypothyroïdie et entreprendre une analyse des mécanismes associant le dysfonctionnement thyroïdien et les lésions observées. Ce projet a pour objectif d'identifier des cibles pour des approches de prévention de la MA.

La complexité des mécanismes cérébraux impliqués ne peut pas être abordée avec des cultures de cellules ou des approches *in silico*. Des expériences comportementales doivent être effectuées sur les rats et l'effectif maximal de rats nécessaires à l'accomplissement du projet est de 492. Afin de limiter le nombre de rats, des tests statistiques adaptés aux petits échantillons seront appliqués. L'approche expérimentale se base sur des stratégies et techniques qui ont montré leur pertinence dans les récentes publications. Les traitements et méthodes sont déjà parfaitement maîtrisés. Dans ce projet, nous nous proposons de tester l'effet du statut thyroïdien sur la mémoire spatiale de travail avec le test du Y-Maze. A ce jour, les effets de ce traitement sur ce test ne sont pas publiés. Si les premiers résultats ne mettent pas en évidence une modification des performances associées au statut thyroïdien, ce test ne sera pas maintenu puisque les expériences visant à relier les mécanismes neurobiologiques aux performances mnésiques des animaux seront inutiles. Le nombre de lots et donc d'animaux sera alors réduit. Par ailleurs, si les premières expériences ne montrent pas d'effet du comportement sur les indicateurs mesurés, le nombre d'animaux sera également diminué puisque le groupe animalerie n'aura plus lieu d'être. La première phase du projet a obtenu plusieurs sources de financement témoignant de sa pertinence et de sa faisabilité. Les protocoles utilisés sont en accord avec des procédures préalablement validées (euthanasie, réduction du stress au cours des tests comportementaux) et les soins apportés aux animaux (manipulations préalables à l'expérimentation, observation régulière des rats pour détecter des signes de détresse ou de souffrance impliquant l'arrêt de l'expérience) sont conçus pour éviter ou limiter au maximum toute souffrance physique ou psychologique.

9859 Les anticorps immunomodulateurs permettent d'obtenir des fontes tumorales durables dans des cancers métastatiques en rechute habituellement non sensibles aux thérapeutiques conventionnelles et dans des types histologiques aussi divers que le mélanome, le cancer du poumon ou le cancer de vessie. L'arrivée de ces anticorps en oncologie pédiatrique est en cours.

Le challenge thérapeutique des années à venir est d'identifier des combinaisons thérapeutiques permettant d'augmenter le nombre de sujets sensibles à ces traitements et en augmenter l'efficacité. Dans notre recherche de nouvelles stratégies d'immunothérapie, nous nous sommes focalisés sur les vaccins infectieux composés d'agents viraux et bactériens qui ont la capacité de stimuler le système immunitaire. Nous avons découvert un vaccin viral qui a la capacité, après injection dans la tumeur, d'induire la mort des cellules cancéreuses uniquement mais surtout de stimuler le système immunitaire ce qui aboutit à une régression complète des tumeurs chez les souris. Nous avons pu optimiser cette réponse antitumorale en le combinant avec un anticorps anti CTLA-4 permettant de lever l'inhibition du système immunitaire. Ces résultats sont très promoteurs car ils montrent la possibilité de rééduquer le système immunitaire contre la tumeur, de la détruire et d'induire une protection à long terme car si on réinjecte des tumeurs au souris, elles ne poussent plus.

Objectif scientifique du projet :

Déterminer si l'effet oncolytique du vaccin Rotavirus est spécifique de la souche vaccinale ou de la souche sauvage.

Le vaccin Rotavirus a été validé in vitro sur des lignées tumorales pour leur propriété oncolytique. Néanmoins, pour apprécier l'interaction entre le système immunitaire et l'activité antitumorale de la souche vaccinale ou la souche sauvage de Rotavirus, il est indispensable de passer chez l'animal. Le nombre de souris utilisées est réduit au maximum sans toutefois compromettre l'interprétation statistique des résultats. Une surveillance adaptée des animaux et une définition de point limites précoces permettent de limiter au maximum la souffrance des souris.

2- Retombées attendues dans le domaine de la cancérologie

Production du rationnel préclinique nécessaire à la réalisation d'un essai clinique de phase I/II testant la faisabilité et la toxicité de la stratégie d'immunisation in situ avec d'injections intratumorales d'agents immunostimulants ou les virus oncolytique.

Nombre total d'animaux inclus dans ce projet : 60 souris

9860 Un nouveau Master de Biologie ouvre à la rentrée 2018 et propose un parcours de Neurosciences qui vise à apporter aux étudiants une formation de pointe dans différents domaines des Neurosciences. Au vu de notre expertise, nous proposons une unité d'enseignement (UE) "Neurobiologie de l'addiction" dans laquelle les étudiants dans le cadre de travaux pratiques évalueront les effets durables d'administrations de cocaïne sur le comportement des animaux, mais aussi sur les adaptations cellulaires engendrées.

Dans cette formation habilitée par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, les travaux pratiques proposés permettront aux étudiants d'acquérir des connaissances théoriques et pratiques dans le domaine de l'addiction, une pathologie cérébrale chronique, qui représente un bon modèle d'étude des phénomènes de plasticité comportementale, structurale et moléculaire.

Les étudiants utiliseront un protocole de sensibilisation comportementale, qui consiste en une augmentation de l'activité motrice en réponse à une même dose de drogue. Les cerveaux des animaux seront récupérés pour des analyses moléculaires.

Dans ce projet, nous avons pris en considération la règle des 3Rs (remplacer, réduire et raffiner).

« Remplacer » : Les études comportementales proposées ne peuvent être réalisées que sur un animal vivant.

« Réduire » : Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, quel que soit le nombre d'étudiants, le nombre d'animaux par groupe expérimental sera conservé (=10). Compte tenu du nombre d'étudiants dans la formation (20 étudiants par an, soit 1 groupe de TP), pour réaliser ces travaux pratiques, nous utiliserons 20 souris maximum par an (1 souris par étudiant), soit 100 souris maximum pour la totalité du projet (5 ans). En effet, le but du TP est de former nos étudiants à la manipulation des souris et à ce type d'expériences comportementales.

Nous avons cherché à réduire le nombre d'animaux à son minimum, ce qui justifie que nous n'ayons pas utilisé d'approches statistiques en amont des expériences pour calculer le nombre d'animaux nécessaires pour ce type d'expériences qui serait plus élevé. D'après notre expérience, ce nombre devrait être suffisant pour permettre toutefois une analyse statistique des effets de la cocaïne en

aval des expériences. Si ce n'est pas le cas, les données obtenues par les étudiants seront complétées par des données obtenues précédemment dans le laboratoire.

« Raffinement » : Pour prévenir toute douleur liée à l'injection de la solution de cocaïne ou de solution contrôle, nous appliquerons sur le ventre des animaux de la lidocaïne ou de la xylocaïne 5 min avant l'injection. Après les injections de cocaïne, les animaux seront surveillés afin de repérer d'éventuels signes de douleurs et d'y remédier.

9861

Les glioblastomes sont les tumeurs primitives du cerveau les plus fréquentes chez l'adulte. Les traitements incluant la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie sont peu efficaces et ces tumeurs demeurent incurables, avec une courbe de survie inférieure à 15 mois.

Il est aujourd'hui admis que les cellules souches de gliomes (GiCs) sont responsables du développement de la tumeur et des récives. Fortement hétérogènes, les glioblastomes se composent d'une part, de territoires enrichis en cellules souches qui se multiplient activement et sont insensibles aux traitements, et d'autre part de zones différenciées, non proliférantes et sensibles aux chimiothérapies. Notre objectif est de contribuer à l'élaboration de nouvelles thérapies anti-cancéreuses en induisant la différenciation des GiCs et leur sensibilisation aux chimiothérapies conventionnelles. Pour cela, nous avons criblé une collection de composés chimiques in vitro puis dans un modèle 3D substitutif qui permet de réduire le nombre de sujets utiles lors de la phase d'expérimentation animale. Ainsi, nous avons identifié trois composés présentant un intérêt thérapeutique réel puisqu'ils sont capables d'inhiber la prolifération des GiCs, de stimuler leur différenciation et d'augmenter leur sensibilité au témozolomide, la chimiothérapie de référence pour le glioblastome. Les tests de toxicité ont montré qu'aucun de ces composés n'induit la mort de cellules normales humaines souches et adultes aux doses efficaces sur les GiCs. Le composé le plus prometteur, DVXXX, est à cette heure testé au laboratoire pour son potentiel à inhiber l'initiation de tumeur à partir des GiCs greffées dans le striatum de femelles Nude de 8 semaines par un traitement systémique intrapéritonéal (PEA467).

Ce nouveau protocole consiste à évaluer un mode d'administration local pour empêcher le développement du glioblastome.

Pour cela nous implanterons, au cours du même temps opératoire, les GiCs dans le striatum de femelles Nude de 8 semaines et une pompe osmotique miniaturisée sous cutanée qui délivrera le candidat médicament ou une solution contrôle au niveau du point d'injection des cellules cancéreuses par l'intermédiaire d'un cathéter et d'un régulateur de débit (procédure n°2). Cette expérience permettra d'étudier l'effet du traitement sur l'initiation du processus tumoral. Nous étudierons également l'effet du traitement sur une tumeur existante. Pour cela, nous générerons un groupe d'animaux où les pompes contenant le produit contrôle seront remplacées par des pompes contenant du DVXXX lorsque les cellules tumorales auront formées une tumeur (procédure n°2). Nous testerons quatre concentrations de DVXXX de manière à trouver le meilleur compromis entre la quantité de chimiothérapie utile et la stabilité de l'effet antitumoral. Les animaux resteront vivants jusqu'au terme de l'expérience (52 semaines) ou l'apparition de points limites définis dans la grille de score garantissant la prévention de la souffrance animale.

Une étape préalable à la réalisation du protocole (procédure n°1) consistera à rechercher le seuil de toxicité du DVXXX en injection intracérébrale. La dose non létale maximale par injection intrapéritonéale (10mg/kg, trois fois par jour pendant trois jours) déterminée dans le cadre d'une prestation de service servira de point de départ pour la recherche de la dose intracérébrale maximale non toxique. Les injections seront réalisées en condition stéréotaxique dans le striatum du cerveau de femelles Nude de 8 semaines, anesthésiées et qui auront reçues une prophylaxie antalgique. Cette procédure nécessitera 12 animaux qui seront sacrifiés une semaine après l'injection ou dès l'apparition de signes cliniques critiques établis selon une grille de score garantissant la prévention de la souffrance animale.

Les hypothèses statistiques que nous avons formulées pour obtenir des résultats significatifs sur la croissance tumorale (procédure n°2) indiquent que 10 animaux seront nécessaires par condition expérimentale. Au total ce projet nécessitera 112 souris ((10 souris par concentration testée + 10 souris contrôles = 50 souris) x2 (lot récive et lot tumeur installée) dans la procédure n°2= 100 souris+ 12 souris pour la recherche de toxicité dans la procédure n°1) qui seront hébergées par

trois ou quatre dans des cages comportant des matériaux propices à augmenter leur bien-être en exerçant les activités spécifiques à leur espèce. Les résultats permettront de déterminer l'efficacité du DVXXX à inhiber la croissance de tumeurs gliales après un traitement local par voie transcrânienne.

Dans la conception de notre projet nous avons attaché un soin particulier au respect de la règle des 3R en :

- Remplaçant autant que possible le recours à l'utilisation d'animaux par le développement de tests sur cultures cellulaires ainsi que dans deux modèles tridimensionnels organotypiques substitutifs mimant l'interaction des cellules cancéreuses avec un tissu cérébral sain,
- Réduisant l'effectif au nombre de sujets strictement nécessaires à l'expérience par la recherche du meilleur compromis entre la grandeur de l'effet recherché et l'exigence d'une forte significativité expérimentale ainsi que par l'utilisation d'un dispositif d'imagerie du petit animal qui assure un suivi longitudinal de la croissance tumorale sans sacrifier d'animal à chaque point de mesure.
- Raffinant les conditions expérimentales par la mise en œuvre d'une prémédication préopératoire systématique garantissant la prévention de la douleur per et post opératoires ainsi qu'en adaptant la grille d'évaluation du bien-être animal aux spécificités du développement des tumeurs cérébrales et notamment en tenant compte dans cette grille de la variation ainsi que d'un seuil de bioluminescence corrélée à la croissance tumorale dont l'appréciation permet de sacrifier les animaux avant l'apparition des signes cliniques.

Ces expériences sont une nouvelle étape du développement préclinique du candidat médicament. De plus, l'étude du mécanisme d'action de ces composés éclairera sur les mécanismes moléculaires de la biogenèse du glioblastome, encore très peu connus.

9862 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. A travers différents projets, notre laboratoire a démontré l'efficacité de cette stratégie contre les tumeurs primaires.

Dans le présent projet, nous souhaitons adapter cette technologie pour lutter contre les métastases osseuses. En effet, ces métastases sont souvent très difficiles à soigner et sont souvent responsables du décès des patients. Il convient donc de trouver de nouvelles stratégies pour améliorer l'arsenal thérapeutique mis à disposition des médecins pour les traiter. Nous étudierons donc les propriétés anticancéreuses d'agents anticancéreux intelligents capables de se déposer sélectivement dans les os et de ne s'activer qu'au niveau de métastases osseuses. Pour mener à bien cette étude nous réaliserons 2 procédures expérimentales avec des méthodes de formation des métastases osseuses différentes. Un total de 120 souris sera nécessaire pour cette étude.

L'action combinée d'un agent anticancéreux vectorisé et d'un agent inhibiteur de l'angiogenèse ne peut pas être abordée in vitro. Ces expériences nécessitent obligatoirement l'usage de modèles animaux. Comme mentionné plus haut, la stratégie de ciblage des tumeurs a déjà été validée par notre laboratoire contre des tumeurs primaires 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 plusieurs 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. 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.

9863 Le trait drépanocytaire (TD) est une forme bénigne de la drépanocytose, une maladie du sang. Le TD est très fréquent dans les populations d'Afrique où le diabète de type 2 (DT2) est aussi très fréquent. Ainsi, un nombre important d'individus est susceptible d'être à la fois porteur du TD et DT2. Bien que le TD soit généralement considéré comme asymptomatique, il a été récemment démontré que les patients diabétiques porteurs du TD (DT2TD) présentaient des altérations plus marquées au niveau du fonctionnement des vaisseaux sanguins comparé à des patients diabétiques non porteurs du TD. Une dysfonction vasculaire chez un modèle murin DT2TD a également été récemment observée (résultats non publiés). Cependant, les mécanismes de ces altérations du fonctionnement vasculaire plus marquées chez les DT2TD sont inconnus. L'objectif de cette étude est d'étudier les mécanismes impliqués dans ces dysfonctions vasculaires. Les résultats issus de ces études permettront d'approfondir les connaissances sur le DT2TD et pourrait aboutir à de nouvelles voies de traitement permettant de retarder la survenue de complications cardiovasculaires.

Aucune méthode alternative ne peut se substituer à l'utilisation d'animaux pour la réalisation de notre projet car il requiert une approche intégrée.

Les démarches mises en œuvre pour suivre la règle des 3R sont :

-Réduction du nombre d'animaux : le nombre de souris nécessaire à nos travaux a été réduit au minimum sans compromettre l'interprétation statistique de nos résultats. Ce projet concernera 200 souris au maximum.

-Réduction de la douleur, souffrance, raffinement : les souris seront suivies avec un soin particulier et des points limites sont clairement définis afin de détecter précocement tout signe de souffrance. Des anesthésiques sont utilisés pendant et au décours des expérimentations et les souris seront placées en couveuse chauffée (37 degrés) pour assurer un confort thermique et réduire ainsi le stress. La récupération post-anesthésie sera particulièrement surveillée notamment des signes de douleur tels que la prostration et l'immobilité afin de mettre à mort rapidement les souris présentant des signes de souffrance.

9864 A ce jour, la survie globale des patients atteints de cancer colique ne dépasse pas 55% et les patients décèdent de leurs métastases. D'autre part, environ 50% des patients ne répondent pas aux traitements conventionnels de chimiothérapie combinés ou non à des thérapies ciblées. De plus, les effets secondaires ont un impact délétère sur le bien-être des patients. Par conséquent les recherches menées pour ce projet portent sur la compréhension des mécanismes impliqués dans le développement de métastases, la réponse aux traitements ainsi que le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Parmi les stratégies envisagées, certaines vont cibler la baisse de la pression en oxygène (hypoxie intra-tumorale) décrite à l'origine de l'agressivité tumorale et la résistance aux traitements.

Les expériences vont cibler l'angiogenèse (formation de nouveaux vaisseaux), des processus moléculaires activées par l'hypoxie, par des mutations et des molécules décrites pour participer à la formation de métastases. Les protocoles seront réalisés chez la souris immunodéprimée greffée avec des tumeurs coliques humaines et/ou des lignées cellulaires coliques commerciales ou générées au laboratoire, et les effets seront observés sur la croissance de la tumeur et sur la formation de métastases dans les organes à distance. Ces études précliniques permettront de proposer la mise en place d'essais cliniques chez l'homme.

La réalisation de ce projet nécessitera l'emploi de 794 souris sur 5 ans. La règle des 3 R sera appliquée pour l'ensemble du projet, à savoir :

Réduire. Les chiffres indiqués dans le dossier représentent le nombre maximal d'animaux utilisés pour ces expériences. En effet, comme il s'agit d'études exploratoires, il ne nous est pas possible de savoir par avance toutes les combinaisons pharmacologiques qui seront testées.

Remplacer. Ces expériences ont pour objectif d'étudier l'impact de drogues sur la croissance tumorale et/ou le développement de métastases. Pour cela, il est nécessaire de préserver le

microenvironnement tel qu'in vivo, à savoir les fibroblastes, les cellules immunitaires, les cellules endothéliales ...). Ces expériences ne peuvent donc être réalisées que sur des animaux vivants et non sur des cultures cellulaires.

Raffiner. Les animaux sont hébergés dans des conditions sanitaires contrôlées et de bien-être optimales (ex : carrés de coton pour la fabrication des nids, balançoires). Les animaux sont surveillés quotidiennement. S'il y a apparition de signes de souffrance au cours de l'expérience (animaux prostrés, perte de poids, poils dégradés ...), les animaux seront traités contre la douleur (ex : kétofène) ou mis à mort si leur état le nécessite.

9865 Ce projet fait partie d'un programme destiné à mettre au point un protocole d'évaluation du bien-être du cheval, fiable et utilisable sur le terrain par les détenteurs ; il doit donc être réalisable facilement et en peu de temps. Il vient compléter les résultats d'une précédente étude dans laquelle nous avons évalué la fiabilité du protocole en question ainsi que la reproductibilité intra- et inter-observateurs, de chacun des indicateurs du protocole.

Toutefois, nous avons conclu que ce protocole manquait d'indicateurs permettant d'évaluer l'état émotionnel des animaux. De plus, nous avons constaté que la seule mesure évaluant l'état émotionnel des animaux présentait peut-être un biais du fait des conditions mêmes de la mesure. Il s'agit de l'appréciation qualitative du comportement qui s'effectue grâce à 13 qualificatifs du langage courant (à l'aise, irrité, apathique, ...) en fonction de la durée de chaque état et de son intensité.

L'objectif de la présente étude est donc de compléter ce protocole d'évaluation du bien-être des chevaux en validant 2 nouveaux indicateurs d'état émotionnel, afin de les ajouter au protocole, et en mesurant de 2 façons différentes l'indicateur « appréciation qualitative du comportement » afin de préciser les conditions d'une bonne mesure.

Cette étude utilisera 8 juments poney Welsh qui seront hébergées dans des conditions restreintes (alimentaires, spatiales et sociales), comme dans le précédent protocole pendant 7 jours. Des mesures expérimentales détaillées de leur comportement (observations par scan sampling) seront réalisées quotidiennement. Elles seront comparées aux 2 nouveaux indicateurs mesurés par des tests de 10 minutes chaque jour. Ces deux indicateurs ont été choisis à partir des observations de postures effectuées dans la précédente étude : 1) attitude (animal attentif, agressif, déprimé...) et 2) position des oreilles en arrière quand le cheval mange. Le troisième indicateur (appréciation qualitative du comportement) sera mesuré de deux façons : 1) de visu face à l'animal tel que prévu dans le protocole et 2) sur enregistrement vidéo sans la présence de l'homme, afin de vérifier si les deux mesures sont corrélées.

Remplacement. Il est nécessaire d'utiliser le modèle cheval, puisque le protocole doit être utilisé dans cette espèce.

Réduction. Dans le présent protocole, nous utiliserons 8 juments. Pour déterminer ce nombre nous nous basons sur les résultats de notre précédente expérience, pour laquelle le calcul de puissance des tests statistiques utilisés donne une puissance satisfaisante (91%) avec 8 animaux.

Raffinement. Afin de créer des conditions restreintes, nous devons travailler dans un milieu appauvri. Toutefois, pour l'alimentation à base de foin, les besoins en énergie des animaux seront satisfaits. La restriction portera sur la durée quotidienne d'alimentation (une distribution matin et soir et non à volonté) et les animaux auront de l'eau à volonté. Pour l'hébergement, les boxes seront plus petits (1,60 m X 3,20 m) que la taille réglementaire, mais seront paillés, ce qui permettra aux animaux d'interagir avec la paille et de se coucher. Ils pourront bénéficier de 2 séquences d'exercice de 1 h 30, au cours de 7 jours d'expérimentation. Pour les relations sociales, les boxes seront adjacents, mais séparés par des cloisons opaques. Les animaux ne pourront pas se voir (sauf pendant les périodes d'exercice dans des paddocks individuels non adjacents), ni se toucher ; ils pourront cependant s'entendre. Ces conditions doivent permettre d'éviter les problèmes de santé majeurs (coliques ulcères). Lors de la précédente étude, où les conditions d'hébergement étaient les mêmes, nous n'avons eu aucun problème de santé.

9866 Le but de la dosimétrie est d'évaluer quantitativement l'énergie déposée dans la matière. La grandeur physique de base de la dosimétrie est la dose absorbée qui exprime la partie de l'énergie

transportée par les rayonnements qui est déposée dans la matière dans laquelle ils interagissent et induisent des effets. Elle correspond à l'énergie moyenne cédée par le rayonnement par unité de masse. La dose absorbée est une grandeur fondamentale qui permet de faire une mesure macroscopique pouvant être corrélée aux effets des rayonnements de tout système biologique.

Ainsi, la validation de la dosimétrie de tous les protocoles d'irradiation mis en place sur les plateformes d'irradiation pour les projets de recherche est essentielle pour le bon déroulement de ces projets. Pour cela, il est parfois nécessaire de valider la dosimétrie in vivo et donc d'utiliser des animaux à des fins scientifiques.

Ce projet a pour objectif de permettre l'utilisation des animaux afin de développer et valider des protocoles de dosimétrie pour tous les projets de recherche utilisant les plateformes d'irradiations. En effet, bien que des fantômes de rats ou de souris existent ou peuvent être fabriqués, les matériaux utilisés pour la fabrication de ceux-ci ont une densité proche de celle de l'eau permettant ainsi une mesure de la dose absorbée en dose dans l'eau. Néanmoins, ces fantômes ne prennent pas en compte les différences de densité des tissus et organes, or le dépôt d'énergie local du aux électrons secondaires créés peut être très différent d'un matériau à l'autre notamment pour les irradiations utilisant des rayonnements X de basse énergie.

Nous projetons d'utiliser pour les besoins de formation 700 animaux sur 5 ans, répartis en 200 rats et 500 souris.

Pour ces besoins, les animaux non utilisés issus de nos élevages internes seront utilisés, ainsi que les animaux commandés mais non utilisés afin de réduire le nombre d'animaux utilisés (et de limiter l'acquisition d'animaux uniquement à ces fins). Pendant toute la durée des procédures expérimentales, les animaux seront hébergés par groupe. L'isolement pourra être fait uniquement en cas d'agression entre congénères. L'euthanasie des animaux pourra être anticipée si des signes de souffrance apparaissent.

9867 Dans le cadre de l'enseignement de la pharmacologie expérimentale, nous réalisons des travaux pratiques sur des animaux vigiles (souris) et sur des organes isolés prélevés après euthanasie. Cet enseignement s'adresse aux étudiants de la filière industrie des études pharmaceutiques en 4ème année (M1), en 5ème année (M2) et aux étudiants en Master 2 Biologie Santé Produits de Santé. Ces étudiants envisagent, par la suite, des carrières professionnelles en recherche et développement des produits de santé et doivent être compétents dans ce domaine. En préambule aux travaux pratiques, un enseignement théorique sur l'expérimentation animale (objectifs, contrainte réglementaire, règle des 3R, bien-être animal,.) et sur la manipulation des rongeurs sont réalisés avant le contact direct avec les rongeurs.

Les travaux pratiques sur souris permettent de mettre en évidence l'action pharmacologique des médicaments sur leur comportement spontané et sur leur sensibilité à des stimuli douloureux normalisés.

L'étude de l'effet pharmacologique induit par la stimulation des récepteurs cholinergiques, histaminergiques (courbe effet/dose) est réalisée sur des organes isolés in vitro (iléon de cobaye). D'autres organes isolés (aorte, duodénum, canal déférent, estomac de rat, trachée de cobaye) sont utilisés pour l'étude d'effets (spasmolytique, bronchodilatateur.) induits par la stimulation d'autres récepteurs ou cibles.

Durant ces travaux pratiques, la souffrance infligée aux animaux est très faible de niveau "gravité légère" : injections de médicaments, mesure de la température rectale, tests sur des appareils mesurant l'activité, la vigilance et mesure du délai de réponse à un stimulus douloureux normalisé. Pour l'ensemble des travaux pratiques, nous utilisons 320 souris, 6 rats et 12 cobayes. Les souris sont réparties par lot et le nombre de souris par lot est réduit à 6 animaux. Des données expérimentales in vivo sont fournies aux étudiants afin de réduire le nombre d'expériences chez l'animal. De plus, nous avons mis au point des travaux pratiques sur logiciels de simulation pour étudier l'effet de certains médicaments.

9868 Les maladies auto-immunes (MAI) représentent aujourd'hui la troisième cause de mortalité dans les pays développés après les affections cardio-vasculaires et le cancer. Il existe plus de 80 MAI parmi lesquelles les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), Maladie de Crohn (MC) et

Rectocolite hémorragique (RCH) qui des besoins médicaux non satisfaits. En effet, la prise en charge des MICI fait appel à des traitements présentant des effets indésirables, un fort taux de non-réponses et des taux d'échappements thérapeutiques importants. Ces deux types de pathologies (RCH et MC) sont dus entre autres à un dysfonctionnement du système immunitaire, en particulier contre la flore intestinal, et notamment à une mauvaise régulation des lymphocytes T (LT).

Nous avons montré le potentiel pro-apoptotique de l'anticorps anti-CD45RC sur les LT effecteurs en transplantation ce que favorise la tolérance allogénique à travers de la potentialisation des LT régulateurs spécifiques du donneur. Le traitement anti-CD45RC était capable d'inhiber non seulement le rejet aigu et chronique des organes solides chez les rats, mais aussi la maladie du greffon-versus-l'hôte (GVHD) chez les rats et la souris NSG humanisée. L'anticorps anti-CD45RC ouvre donc la voie à de nouvelles biothérapies innovantes, plus sélectives, moins toxiques et à fort potentiel d'efficacité en transplantation et de la même façon en auto-immunité.

L'objet de cette saisine est d'évaluer le potentiel thérapeutique de l'anticorps anti-CD45RC humaine dans des modèles précliniques de colites inflammatoires chez la souris NSG humanisée, puisque cet anticorps humain ne possède pas de réactivité-croisée avec les rongeurs.

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

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

- Réduire : Le nombre d'animaux par groupe est réduit à 10 souris, nombre nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. Les tests statistiques utilisés seront non paramétriques (Test de Mann-Whitney) car nous ne pouvons pas assurer d'une distribution normal ($n < 30$). Nombre total de souris : 350 répartis sur les cinq modèles différents de colite (70 souris par modèle avec 7 groupes de 10 souris). Le nombre de groupes a été réfléchi de sorte à avoir les contrôles suffisants pour pouvoir conclure quant aux résultats obtenus.

-Raffiner : Les animaux seront suivis quotidiennement lorsque le modèle de colite sera induit et les signes cliniques notables et sévères seront notés. Lorsque deux signes cliniques notables seront présents alors il sera administré deux fois par jours une dose de morphinique (buprénorphine 0.05mg/Kg en sous cutané), puis lorsque 3 signes cliniques notables ou 1 seule signe sévère seront notés alors les animaux seront sortis du protocole pour la mise à mort. Tous les animaux seront analysés post-mortem avec des prélèvements d'organes en vue des études immunohistochimiques et histobiologiques permettant de caractériser au mieux le bénéfice du traitement avec l'anticorps anti-CD45RC. Les résultats obtenus permettront de déterminer le potentiel thérapeutique de l'anticorps anti-CD45RC humain sur les réponses immunes intervenant dans des contextes de maladies auto-immunes au niveau de l'intestin et de mieux comprendre ses mécanismes d'action par les analyses des souris traitées. L'utilisation d'un anticorps anti-CD45RC fait l'objet d'un brevet quant à son potentiel thérapeutique prometteur dans le domaine de la transplantation d'organe solide et de la GVHD mais aussi pour le traitement de maladies auto-immunes. La validation de la molécule dans ce modèle préclinique de souris humanisée est la dernière étape indispensable avant les tests cliniques.

9869 Les anticorps monoclonaux produits sur souris, issues d'élevages agréés, sont utilisés dans des réactifs de diagnostic in vitro. Ces réactifs permettent de dépister des maladies infectieuses telles que, pour exemple, le sida, les hépatites, la toxoplasmose ou les méningites bactériennes. Le principe de détection de ces kits repose sur la réaction spécifique d'antigènes viraux ou bactériens avec ces anticorps monoclonaux.

Sans ces anticorps monoclonaux, les réactifs de diagnostic produits ne seraient pas à la hauteur des performances attendues en termes de qualité et de quantités de tests de dépistage des maladies infectieuses.

Dans le cadre de la règle des 3R : l'aspect réduction du nombre d'animaux est traité via une politique de réduction de nos stocks d'anticorps nécessitant de ce fait moins d'animaux cependant 39000 animaux seront utilisés en 3ans.

De plus des études de remplacement sont en cours et permettent déjà de projeter de diminuer ce chiffre.

Les conditions d'hébergements des souris satisfont au principe de raffinement avec l'utilisation de cages adaptées avec un enrichissement de leur environnement. Une surveillance quotidienne des animaux est mise en œuvre par un personnel habilité.

9870 Les anticorps polyclonaux de lapins sont utilisés pour produire des kits de diagnostic servant principalement pour le dépistage de maladies bactériennes (pour exemple : les salmonelloses).

Le principe de détection repose sur la réaction spécifique des antigènes de bactéries avec les anticorps issus de l'immunisation.

Pour obtenir ces anticorps polyclonaux, une suspension antigénique inactive est injectée aux lapins afin de solliciter leur système immunitaire complet pour la production d'anticorps (principe de la vaccination). Les lapins sont utilisés pour fabriquer plus de 200 types d'anticorps polyclonaux. Le choix du modèle animal lagomorphe est motivé par l'équilibre entre l'utilisation d'un animal modérément sensible à la souffrance et les besoins en volume sanguin suffisant (l'utilisation d'animaux plus petits aboutirait au sacrifice d'un plus grand nombre d'animaux et inversement, l'utilisation d'animaux plus grands engendrerait une surcapacité de production).

Dans le cadre de la règle des 3 R : l'aspect réduction du nombre d'animaux est traité via une politique de réduction de nos stocks de sérums de lapins nécessitant de ce fait moins d'animaux (néanmoins 1100 lapins seront utilisés dans les 33 prochains mois)

Aucun modèle alternatif à cette production d'anticorps polyclonaux n'a pu aboutir à ce jour (par nécessité d'avoir un système immunitaire complet.)

Les conditions d'hébergement des lapins satisfont au principe de raffinement avec l'utilisation de cages adaptées avec un enrichissement de leur environnement.

9871 Le but de cette étude est de tester de nouvelles molécules candidates dans le cadre du traitement pour l'achondroplasie. Nous avons actuellement une molécule candidat initiale mais nous souhaitons développer de nouvelles molécules avec une demi-vie plus longue afin de réduire la fréquence d'injection pour avoir une efficacité dans notre modèle murin d'achondroplasie.

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. Nous avons mis au point un traitement par protéine thérapeutique en cours de développement clinique. Le but de cette étude est de raffiner encore le traitement en cours de développement et de permettre aux enfants traités un nombre d'administration du traitement très significativement diminué.

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 une évaluation in vitro des molécules à tester afin de ne tester in vivo que les molécules présentant un potentiel thérapeutique élevé. Ceci est 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 nécessaires, 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 de santé des animaux au cours des procédures grâce à l'établissement de points limites précoces. Nous estimons que nous allons utiliser au maximum 1200 souris soit 10 expériences de 120 souris chacune.

9872 La transplantation cardiaque est le traitement de référence de l'insuffisance cardiaque terminale. Cependant le nombre de donneurs d'organe est insuffisant en France avec un greffon cardiaque disponible pour deux receveurs en attente. Nous souhaitons développer une approche alternative, actuellement non pratiquée en France, afin d'augmenter le nombre de donneurs éligibles pour la transplantation cardiaque : le prélèvement sur donneurs décédés après arrêt circulatoire (DDAC).

Il s'agit de personnes décédées en réanimation suite à une limitation ou un arrêt des thérapeutiques actives (catégorie 3 de la classification de Maastricht). Des prélèvements multi-organes (poumons, foie, reins) sont réalisés en France sur les DDAC depuis 3 ans, mais pas de prélèvement cardiaque. La principale limite au prélèvement cardiaque chez les DDAC est la durée d'ischémie chaude du cœur entre le moment où le décès du patient est déclaré dans sa chambre de réanimation, et le prélèvement multi-organe effectué au bloc opératoire. Une circulation régionale normo-thermique (CRN) est implantée par voie fémorale en réanimation une fois le décès du donneur déclaré afin de rétablir une perfusion pour les organes abdominaux. Cependant le cœur n'est pas perfusé par ce système car un ballon d'occlusion est placé dans l'aorte thoracique descendante pour éviter de perfuser le cerveau. Le donneur est ensuite transporté au bloc opératoire pour réaliser les prélèvements d'organe, or pendant toute cette période, le cœur est non perfusé, en ischémie chaude, et donc à haut risque de développer des lésions sévères pouvant conduire jusqu'à l'infarctus. Nous supposons donc que si le cœur était prélevé dans ces conditions puis transplanté, cela conduirait à une défaillance primaire du greffon cardiaque irréversible. La validation préclinique d'un protocole de prélèvement avec protection myocardique est ainsi nécessaire tout en respectant les contraintes et modalités du protocole actuel de prélèvement multi-organe sur DDAC. Notre étude a deux principaux objectifs :

- 1) Démontrer que le cœur prélevé dans les conditions actuellement définies dans le protocole Maastricht 3 français présente des lésions myocardique sévères et une incompetence fonctionnelle qui le rendent inutilisable pour une transplantation cardiaque.
- 2) Valider une méthode de protection myocardique efficace, reproductible et compatible avec le protocole Maastricht 3 français, limitant les dommages tissulaires liés à l'ischémie chaude et permettant l'utilisation de ces cœurs pour la transplantation cardiaque.

Aucune étude scientifique ne permet actuellement de répondre à ces deux objectifs. Notre travail est un prérequis pour obtenir l'autorisation de l'Agence de la Biomédecine de prélever le cœur chez les DDAC. Il n'existe à ce jour aucun modèle de simulation ni d'autre modèle alternatif de prélèvement d'organe sur DDAC. Nous utiliserons un modèle porcin de décès par arrêt circulatoire anoxique. Le choix du gros animal se justifie pour se placer dans les conditions anatomiques les plus proches du protocole clinique Maastricht 3 français, notamment pour la mise en place de la CRN par canulation des gros vaisseaux permettant une assistance circulatoire dès le constat du décès de l'animal. Nous utiliserons 12 porcs de 40 kg dans cette étude. Après respect d'une période d'acclimatation de 5 jours entre congénères pour réduire l'anxiété, les porcs seront répartis de façon aléatoire dans deux groupes expérimentaux. Afin de réduire le nombre d'animaux, nous ne comparerons que deux approches de prélèvement cardiaque :

- 1) ischémie chaude (groupe contrôle, n=6 porcs)
- 2) protection par cardioplégie antérograde à 4°C (groupe préservation, n=6 porcs)

Dans un souci de réduction, l'analyse de la viabilité myocardique sera effectuée in situ sur les mêmes animaux, réalisant un modèle d'auto-transplantation cardiaque. En effet, après une période de reperfusion cardiaque de 3 heures grâce à la CRN, l'assistance circulatoire sera progressivement sevrée. Une étude de la performance cardiaque par les boucles pression-volume intra-ventriculaire gauche et par échocardiographie transthoracique sera réalisée pour apprécier la viabilité myocardique. Enfin, après sacrifice des animaux, une analyse histologique des cœurs explantés sera réalisée à la recherche de lésions d'infarctus, mais également pour quantifier les lésions d'ischémie reperfusion.

L'ensemble de ces procédures sera réalisé sous anesthésie générale par un mélange couvrant les composantes hypnotiques et analgésiques de l'anesthésie et conformes aux principes de l'expérimentation animale.

9873 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. Au stade métastatique ganglionnaire, le taux de survie à 5 ans est inférieur

à 50% et au stade de métastases viscérales, la médiane de survie est inférieure à 6 mois. 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 (10 000 nouveaux cas en 2007), 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. De plus, après une courte période de rémission, le mélanome acquiert une résistance, augmentant d'environ 2 mois l'espérance de vie du patient. D'autres thérapies ont été mises en place telles que l'immunothérapie qui réactive la réponse immunitaire du patient mais ces thérapies ne donnent une réponse positive que dans 10 à 30% des patients. Il est donc nécessaire de développer de nouveaux traitements. Nous nous sommes intéressés aux effets des antidiabétiques. Plusieurs expérimentations ont montré que ces composés étaient capables d'induire la mort des cellules de mélanomes. Nous avons synthétisé plusieurs dérivés de ces antidiabétiques qui induisent également la mort des cellules de mélanome sensibles mais aussi résistantes aux thérapies actuelles sans affecter la viabilité de cellules normales. Afin d'avoir une approche plus physiologique, nous aimerions tester ces différentes molécules sur des modèles de rongeurs en combinaison avec les immunothérapies afin d'observer si nos composés seraient capables de potentialiser leurs effets. Nous réaliserons des expériences d'allogreffe ainsi que de développement de métastases chez des souris immunocompétentes, d'une part à partir de cellules de mélanome murin et d'autre part, nous élargirons notre étude à d'autres cancers (du côlon et du pancréas) dont l'efficacité a déjà été démontrée in vitro (Remplacement de la règle des 3R) sur plusieurs types de lignées de cellules cancéreuses dont le cancer du sein, de la prostate, du côlon et du pancréas. Nous effectuerons ces expériences d'allogreffes chez des souris immunocompétentes C57Bl/6j (pour les cellules de mélanome et de pancréas) ou des souris BALB/C (pour les cellules de côlon) afin d'observer les effets de nos composés en combinaison ou non avec l'immunothérapie sur l'évolution des tumeurs. Par conséquent, ce projet comporte 4 procédures expérimentales, afin d'obéir à la règle de « Réduire » des 3R, nous avons choisi l'utilisation de 10 souris par groupe expérimental (nombre minimal et statistique déterminé dans la littérature). Tout le long de chacune de ces expériences, les animaux seront maintenus dans un milieu enrichi et seront hébergées en portoirs ventilés à raison de 5 souris/cage (500cm²). De plus, elles seront surveillées quotidiennement par l'équipe animalière et par les expérimentateurs afin de déceler tout signe de souffrance. Le nombre total de souris qui seront utilisées dans ce projet est donc de 1200 souris, réparties sur les 4 procédures expérimentales. Globalement, l'objectif de cette étude est de valider dans des modèles murins syngéniques l'efficacité de nos composés antidiabétiques en monothérapie et en association avec des inhibiteurs d'immune checkpoint. Cette étude in vivo constituera le préalable indispensable en vue des premiers essais chez l'Homme.

9874 Notre projet de recherche vise à mieux comprendre les mécanismes pathophysiologiques responsables du dérèglement de l'excitabilité neuronale observé dans les crises d'épilepsies.

Les canaux ioniques sont les acteurs majeurs de cette excitabilité neuronale et leur étude est fondamentale pour la compréhension des mécanismes impliqués dans ces pathologies. Notre projet de recherche concerne plus particulièrement les canaux ioniques sélectifs au sodium et dépendants du potentiel (Nav). Ces derniers sont responsables de la genèse et de la propagation du potentiel d'action. De nombreuses mutations observées sur plusieurs types de canaux ioniques sont responsables des différentes formes génétiques d'épilepsie souvent graves, pharmaco-résistants et présentant des déficits cognitifs. L'impact fonctionnel de plusieurs mutations sur l'activité des canaux ioniques a jusqu'à présent été étudié surtout dans des cellules non neuronales, ce qui a abouti à des résultats controversés car les conditions expérimentales ne reproduisent pas les conditions pathophysiologiques. Afin de pallier ce problème, notre groupe s'intéresse à l'effet de ces mutations, dans plusieurs modèles et avec des approches expérimentales variées, reproduisant les conditions physiopathologiques et préservant la diversité et les propriétés des réseaux neuronaux. Afin de réduire au maximum l'utilisation des animaux, nous étudions les courants ioniques à partir de cultures neuronales in vitro exprimant les canaux mutés pour comprendre leurs changements de fonctionnalité. Afin de comprendre comment ces mutations modifient la coordination des neurones entre eux, nous réalisons également des études intégrées dans des

réseaux neuronaux sur des tranches de cerveau ex vivo, ce qui réduit le nombre d'animaux utilisés (plusieurs tranches utilisées pour chaque animal). Cependant, les études des phénotypes générés par les mutations et le développement des stratégies thérapeutiques nécessitent des expérimentations in vivo.

Nous proposons dans ce projet d'utiliser deux différents modèles d'épilepsie avec des souris génétiquement modifiées qui récapitulent deux différentes pathologies humaines : la syndrome de Dravet et la GEFS+ (Generalised Epilepsy with Febrile seizure plus). Dans le premier cas, les souris (tout comme les patients) présentent des crises épileptiques spontanées et des troubles cognitifs. Dans le deuxième cas, l'induction d'une crise d'épilepsie peut être obtenue par augmentation de la température sur notre modèle de souris génétiquement modifiées (l'augmentation de température déclenche des crises aussi chez les patients). Les souris non génétiquement modifiées ne déclenchent pas de crises d'épilepsie lors de l'augmentation de température. Nous utilisons des souris car des lignées génétiquement modifiées sont disponibles, leur reproduction est bien maîtrisée, et elles permettent des enregistrements in vivo et des analyses comportementales.

L'objectif de notre projet est donc la compréhension des points communs et des différences parmi les deux modèles et en particulier les altérations de l'activité des réseaux de neurones impliquées dans l'aggravation du phénotype et la génération des déficits cognitifs. Enfin, on testera des nouvelles approches thérapeutiques. Les différentes approches pour répondre à cette question sont les suivantes :

1) Etudier les propriétés électriques des réseaux de neurones de nos modèles de souris génétiquement modifiées avec des enregistrements d'électrocorticogramme et de potentiel de champ local sur animaux vigiles, appareillés au préalable par la pose d'électrodes corticales et hippocampiques sous anesthésie générale.

2) Etudier les conséquences fonctionnelles des altérations génétiques et de l'activité épileptique sur l'activité et le dialogue parmi l'hippocampe et le cortex en réponse à des stimuli neutres ou sociaux.

3) Evaluer les effets d'un traitement pharmacologique précoce sûr le développement des différents symptômes chez les souris adultes.

Ce projet prendra en compte la règle des 3Rs. En particulier, comme précédemment mentionné, notre équipe utilise des techniques complémentaires (cultures neuronales, enregistrements sur tranches) qui limitent le recours à l'expérimentation animale au cas où elle n'est pas remplaçable. Le nombre d'animaux sera réduit au minimum, en conservant un nombre suffisant pour obtenir des statistiques fiables. A la fin des différentes procédures les animaux seront sacrifiés dès que possible afin de faire des études d'histologie et de limiter les colonies. Toutes procédures expérimentales seront visées à réduire au minimum la souffrance des animaux et améliorer leur qualité de vie (anesthésie/analgesie, évaluation de la douleur et définition des points limites).

Pour ce projet nous prévoyons l'utilisation d'un nombre maximal de 974 souris sur une période de 5 ans.

A terme, ces études vont améliorer notre connaissance des mécanismes impliqués dans l'épilepsie et devraient permettre la mise au point de traitements ciblés et efficaces des crises d'épilepsies qui font actuellement défaut.

9875 Les traumatismes graves sont la première cause de décès dans le monde des sujets jeunes. Les deux principales causes de décès sont le traumatisme neurologique catastrophique et le choc hémorragique.

Le choc hémorragique est caractérisé par une perte brutale de sang qui compromet l'apport en nutriments et en oxygène aux organes. Le choc hémorragique isolé entraîne 30% de décès dont la moitié survient dans les 2 heures de prise en charge. Les traumatismes sévères à l'origine du choc hémorragique entraînent également des lésions tissulaires, le tout conduisant au développement de défaillances d'organes sévères.

Les mécanismes impliqués sont assez divers : hypotension (baisse de pression artérielle), hypoxémie (baisse de l'oxygène dans le sang), anémie (perte d'hémoglobine, transporteur d'oxygène), bas débit cardiaque, défaillance microcirculatoire (défaillance de perfusion des vaisseaux sanguins de moins de 150µm de diamètre), lésions tissulaire diverses (destruction des

cellules et relargage de produits de dégradation toxiques), endothéliopathie (altération de la paroi interne des vaisseaux) et coagulopathie (défaillance de la coagulation).

La rhabdomyolyse se définit par une rupture de l'intégrité des cellules musculaires striées squelettiques, responsable de la fuite du contenu intracellulaire dans la circulation générale. L'insuffisance rénale aiguë est une complication sévère et fréquente de la rhabdomyolyse. Parmi l'ensemble des mécanismes impliqués, la vasoconstriction rénale est un élément important, responsable d'une hypoperfusion rénale. La survenue d'une insuffisance rénale aiguë au cours d'une hospitalisation est un facteur de risque indépendant de mortalité hospitalière et expose au risque d'insuffisance rénale chronique.

Dans notre pratique clinique en traumatologie sévère, la rhabdomyolyse est fréquemment associée à une hémorragie sévère. Une des défaillances d'organes les plus sévères, l'insuffisance rénale aiguë (nécessité de réanimation prolongée, de dialyse et séquelles définitives pour les cas les plus graves) est particulièrement associée aux traumatisés les plus graves présentant un choc hémorragique et une rhabdomyolyse.

Dans une étude récente, non encore publiée portant sur les patients victimes de choc hémorragique traumatique, nous avons comme facteurs associés au développement d'une insuffisance rénale aiguë sévère la quantité de transfusions et la survenue d'une rhabdomyolyse.

L'objectif de ce projet est de caractériser les lésions rénales provoquées par une double agression reproduisant les mécanismes lésionnels des traumatismes graves associant choc hémorragique et rhabdomyolyse (induite par injection intramusculaire de glycérol), chez le porc réanimé.

Ce modèle, une fois validé, aura pour but, de tester l'efficacité de différentes stratégies de réanimation, lors de ces agressions, sur la fonction rénale.

Nous évaluerons donc la fonction et la perfusion rénale au cours de la phase aiguë de l'agression rénale c'est à dire pendant les 48 premières heures post-agression.

Au maximum, 40 porcs, répartis en quatre groupes de 8 à 10 animaux seront nécessaires pour réaliser ce projet.

Ces groupes sont :

- Un groupe contrôle
- Un groupe avec rhabdomyolyse seule
- Un groupe avec choc hémorragique seul
- Un groupe avec choc hémorragique et rhabdomyolyse

Ce travail est la suite d'une étude chez le porc ayant porté sur les conséquences rénales de différentes stratégies de réanimation du choc hémorragique. Le modèle utilisé sera le même que pour l'étude précédente (avec la rhabdomyolyse en plus).

Le modèle est particulièrement adapté à l'étude de paramètres multiples avec un animal dont les caractéristiques hémodynamiques sont proches de l'homme. Ces travaux n'ont pas été réalisés d'après la littérature.

Les conséquences physiologiques du choc seront étudiées de manière multiparamétrique : mesure dynamique continue du lactate et de sa clairance, mesure du débit cardiaque, mesure de la microcirculation intestinale et sublinguale, mesure de l'oxygénation tissulaire intestinale et mesure de l'oxygénation, de la perfusion et de la fonction rénale.

Actuellement, il n'existe aucune méthode in vitro permettant de répondre à notre objectif. Cependant, d'après la littérature, 8 animaux par groupe sont suffisants pour valider une différence 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 porcs par groupe. Cette mesure pourrait épargner l'utilisation de 8 porcs (2 par groupe).

L'ensemble de cette procédure sera réalisé sous anesthésie générale par un mélange couvrant les composantes hypnotiques et antalgiques de l'anesthésie. Nous avons utilisé des techniques d'analgésie post-opératoires afin d'optimiser l'analgésie en plus des traitements habituels : infiltration avec des anesthésiques locaux de longue durée pour couvrir les 24 premières heures, patch adhésif d'anesthésie locale pour les 24 heures suivantes.

Nous utiliserons dans cette étude 40 porcs qui seront stabulés par groupe de deux dans des cages de 2m² lors de la période d'acclimatation (individus de poids de 40kg) pour permettre un contact régulier entre congénères et réduire ainsi les stress.

Afin de tenir compte des besoins quotidiens de nos animaux et d'améliorer leur bien-être, leur environnement sera enrichi (activité de foussement encouragée, médecine-ball, jeux dans le couloir, planche à gratter, distributeur d'aliment actif.).

9876 La Pyrimidine est un nucléotide essentiel dans un grand nombre de processus biologiques tels que la synthèse d'ARN et ADN. Afin d'éviter une trop forte accumulation dans l'organisme elle est dégradée par la dihydropyrimidine dehydrogenase, enzyme codé par le gène Dpyd. La mutation de ce gène va entraîner une altération de la dégradation de la pyrimidine pouvant avoir des effets toxiques sur les fonctions neurologiques (retards psychomoteurs, des convulsions, des retards de croissance, des microcéphalies, des dysmorphies, de l'autisme, des hypotonies, ou encore des anomalies oculaires), ou pouvant favoriser la génération de mutations génétiques et donc le développement de tumeurs.

Afin d'étudier l'impact d'une augmentation de la concentration en pyrimidine dans l'organisme ou l'absence de dihydropyrimidine dehydrogenase sur certaines pathologies humaines, un modèle de souris délétée pour le gène Dpyd a été généré.

Une première étude a mis en évidence une possible atteinte de la production de globules blancs. C'est pourquoi des tests complémentaires vont être réalisés sur 2 cohortes de 10 souris mutantes et 10 souris contrôles. Un prélèvement sanguin sera ainsi effectué pour réaliser une numération formule sanguine, ainsi que pour envoyer du plasma et des organes au laboratoire porteur du projet. Le thymus et la rate seront prélevés pour faire une analyse plus détaillée des populations des thymocytes et des splénocytes (cellules précurseurs des globules blancs circulants) par cytométrie de flux.

Remplacement : L'approche animale se justifie par l'existence de plusieurs souris invalidées par ce gène d'intérêt, réaliser une étude sur l'animal nous permettra de se rapprocher de la physiopathologie humaine, notamment pour l'analyse des paramètres hématologiques et des populations des cellules précurseurs des globules blancs circulants.

Réduction : Nous allons utiliser 2 cohortes de 10 animaux mutants et 10 animaux contrôles, soit 40 souris. Ce nombre est réduit à son minimum nous permettant d'avoir des résultats interprétables et statistiquement significatifs.

Raffinement : les animaux feront l'objet d'un suivi rapproché afin d'éviter toute souffrance.

9877 L'ensemble des instances nationales et internationales s'accordent à dire que le vieillissement de la population est une des tendances les plus significatives du 21^{ème} siècle. La proportion des personnes âgées augmente à une vitesse plus importante que le nombre de la population et les personnes vivent plus longtemps atteignant une espérance de vie grandissante et plus extrême que jamais. Cette augmentation témoigne de l'amélioration très positive des conditions de vie et de l'amélioration constante de la médecine mais soulève un certain nombre de questions quant à l'apparition de pathologies liées au vieillissement et leurs conséquences en termes de prise en charge et gestion thérapeutique. A l'heure actuelle, la prise en charge médicale de pathologies telles que la maladie d'Alzheimer ou Maladie de Parkinson par exemple ne reste que très rudimentaire et bien souvent inefficace. En effet, le développement de thérapeutiques efficaces requière en premier lieu la modélisation de ces pathologies et par conséquence le développement de modèles pertinents mimant les caractéristiques cliniques, symptomatologiques tout comme les aspects physiologiques. Malgré des avancées notoires obtenues par l'utilisation de tels modèles, notamment murins, dans la compréhension des pathologies du vieillissement, la distance phylogénétique et les différences physiologiques entre ces modèles et l'homme rendent l'obtention de thérapies efficaces concernant les maladies neurodégénératives difficile. C'est pourquoi, l'utilisation de modèles se rapprochant de l'être humain devient une nécessité et les Primates Non Humains (PNH) constituent les meilleurs modèles pour ces pathologies. Dans ce contexte, il peut s'avérer nécessaire, pour certaines pathologies, d'être en mesure de créer des modèles pathologiques dès la naissance de l'individu.

L'objectif du projet est donc d'établir et de vérifier la reproductibilité de techniques de procréation médicalement assistée chez le modèle marmouset sans appliquer de procédures expérimentales visant à créer un modèle pathologique. L'utilisation des techniques de reproduction assistée chez

le marmouset ne présente à ce jour qu'un taux de succès relativement faible. Ce constat s'explique par le fait que peu d'équipes scientifiques maîtrisent cette technique de façon reproductible ; la reproduction assistée n'étant encore qu'à son balbutiement pour les primates et plus précisément pour le marmouset. C'est pourquoi, dans une optique de raffinement, le développement de méthodes efficaces permettrait d'atteindre une meilleure maîtrise de ces techniques et ainsi réduire ce taux d'échec. De plus, la maîtrise de ces techniques de reproduction assistée permettra par la suite la réalisation de projets scientifiques de plus grande ampleur, notamment en dans le domaine des neurosciences appliquées et de la génétique.

L'équipe porteuse du projet présente une expertise en techniques de reproduction assistée suite à la réalisation d'un précédent projet sur le modèle babouin. C'est dans ce cadre que s'inscrit ce projet en visant cette fois-ci le développement et la mise en place de techniques de reproduction assistée pour une autre espèce de primate, le marmouset. 6 individus adultes marmousets seront impliqués dans ce projet afin de collecter des gamètes mâles et femelles, de réaliser des fécondations in-vitro et des transferts embryonnaires en vue d'obtenir des naissances. Ce nombre d'individus est le nombre minimal requis afin de pouvoir débiter la mise en œuvre de procédures expérimentales et de valider leur efficacité. Le nombre d'individus impliqués dans le projet est donc réduit au maximum. De plus, la méthodologie proposée (stimulation pénienne, transfert embryonnaire) vise à raffiner au maximum les procédures expérimentales : les collectes de sperme se font sans anesthésie générale (individus vigiles) et par stimulation pénienne ce qui constitue un raffinement de la procédure classique (électro-éjaculation sous anesthésie générale). De plus, nous avons construit un système de contention de l'individu male qui lui permet d'avoir une liberté de mouvement de ses membres antérieurs sans exercer de contention manuelle sur l'individu. L'individu est récompensé par des items alimentaires durant la procédure. Concernant les femelles, le transfert embryonnaire se fera par voie naturelle évitant ainsi une laparotomie sous anesthésie générale. Durant l'anesthésie pour la collecte ovocytaire, les individus seront monitorés et maintenus à une température suffisante par la table chauffante. De plus, une analgésie pré, per et post-opératoire sera mise en place. Dans ce contexte, il est impossible de remplacer le modèle primate par un autre modèle animal.

Les dommages éventuels liés aux procédures expérimentales sont minimes et similaires à ceux observés en médecine humaine lors d'hyperstimulation ovarienne (nausées, maux de tête, douleur abdominale) et les risques liés aux chirurgies (laparotomie) sont extrêmement réduits du fait de l'expertise de l'équipe réalisatrice du projet et du plateau technique associé.

9878 Dans les pays développés, la sédentarité associée aux apports alimentaires très énergétiques a entraîné la survenue de nombreux cas d'obésité. D'après l'OMS, le nombre d'individus obèses (IMC > 30) ou en surpoids (IMC > 25) a plus que doublé depuis 1980, représentant en 2014 près de 2 milliards d'Humains, soit 39% de la population âgée de plus 18 ans.

Il existe deux types de graisses, le tissu adipeux blanc et le tissu adipeux brun. Le tissu adipeux blanc constitue la réserve de gras et représente une importante réserve d'énergie. C'est aussi ce tissu qui s'accumule en cas d'obésité.

Le tissu adipeux brun est par contre capable de fabriquer de la chaleur à partir de la graisse, comme c'est notamment le cas chez les mammifères hibernants (marmottes) ou chez les nouveau-nés. Il aide notamment à brûler les graisses blanches.

Ce tissu semble être une cible prometteuse pour de nouveaux traitements contre l'obésité en permettant de réduire la quantité de lipides stockés.

Ici, nous proposons de greffer des cellules de tissu adipeux brun dans un modèle génétique de souris obèses afin de mettre en évidence cette capacité à réduire les graisses présentes.

Après implantation des cellules, un suivi régulier sera réalisé (poids, température, glycémie, analyses sanguines).

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 d'environnements enrichis. Nous appliquerons également le principe de raffinement au niveau des méthodes de pré-anesthésie, d'anesthésie et de prise en charge post-opératoire.

Deux études seront menées consécutivement dans notre projet :

- une étude pilote utilisant 15 animaux, pour valider la preuve de concept
- une étude plus complète avec 33 animaux pour confirmer les résultats et acquérir plus de données expérimentales.

Au total, ces deux études représenteront 48 animaux au total.

D'un point de vue éthique, cette étude ne peut être menée avec un autre modèle, en effet, nous avons besoin d'étudier ce protocole au sein d'un organisme complexe vivant et l'approche cellulaire ou in silico ne permet pas de remplacer cela pour l'instant.

Par ailleurs, les effectifs ont été réduits afin de limiter au maximum l'usage d'animaux dans ce protocole.

D'un point de vue bien-être, nous n'attendons pas de souffrance ou de points limites éthiques liés à ce protocole. Néanmoins, un suivi quotidien des animaux et de leurs conditions d'hébergement sera appliqué.

Tout animal présentant des signes de douleurs, de prostration ou un mauvais toilettage sera suivi plus particulièrement, notamment au niveau du poids, et des points limites seront mis en place pour éviter toute souffrance.

9879 Une transition nutritionnelle s'est opérée dans les pays industrialisés ces 50 dernières années, avec une consommation plus élevée d'aliments riches en graisses saturées et en sucres rapides, laquelle joue un rôle central dans l'épidémie d'obésité et de maladies chroniques associées (stéatose hépatique, insulino-résistance).

Ce projet vise à explorer chez la souris l'impact d'un régime alimentaire enrichi en molécule de lipides (FAHFAs) naturellement présent dans les aliments et dans l'organisme et pour lesquels il a été très récemment montré des effets potentiellement bénéfiques sur certaines complications liées à l'obésité.

Nous avons choisi pour cette étude le modèle souris car il présente des symptômes similaires à ceux qui définissent le syndrome métabolique chez l'Homme. Des souris males C57Bl6 (10 animaux par groupe, soit au total 130 souris) pesant environ 25g seront utilisées dans ce projet. Elles recevront leurs régimes respectifs (régime témoin ou régime obésogène enrichi ou non en FAHFAs) pour une période de 12 semaines. Le poids corporel et la consommation alimentaire des souris ainsi que leur état sanitaire seront évalués tout au long de l'expérimentation. En fin de régime, les animaux subiront un test de tolérance au glucose (procédure 1) et de tolérance à l'insuline (procédure 2) puis seront euthanasiés. Dans une première série, 3 molécules de FAHFAs différentes seront testées à une dose donnée dans les régimes contrôles et obésogène, puis dans une deuxième série la molécule la plus efficace sera testée à 3 doses différentes dans le régime obésogène.

Nous explorerons le phénotype musculaire et l'activité mitochondriale dans le foie et dans le muscle, et plus largement les désordres métaboliques associés à l'obésité tels la stéatose hépatique et l'insulino-résistance.

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

- « Réduire » le nombre d'animaux en expérimentation

Pour nos expérimentations, nous avons prévu le nombre nécessaire d'animaux pour garder une puissance statistique dans le traitement de nos résultats. Pour chaque série nous devons obligatoirement avoir un groupe contrôle puisqu'il s'agit d'analyses métaboliques pouvant être influencé avec une variabilité inter-expérimentation. Nous mènerons nos expérimentations en deux phases. Dans la première phase nous identifierons la molécule FAHFAs la plus efficace. Si à l'issue de ce premier test les résultats ne sont pas satisfaisants, nous ne réaliserons pas la deuxième phase mais reprendrons les tests in vitro pour l'identification de nouvelles molécules bioactives.

- « 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 de nos animaux. Les régimes nutritionnels proposés n'induisent pas de pathologie métabolique (diabète, maladies cardiovasculaires, hypertension artérielle). Le cas échéant, les suivis quotidiens des animaux permettent d'identifier des signes de souffrance

caractérisés par l'état du pelage, le comportement de la souris (agressivité / apathie), cris, mobilité, alimentation...

- « Remplacer » les modèles animaux :

Il n'existe pas de modèle cellulaire reproduisant nos procédures expérimentales puisqu'il s'agit d'analyses nutritionnelles et métaboliques.

9880 Notre laboratoire étudie le lien étroit entre la signalisation cellulaire et le métabolisme particulier des cellules cancéreuses. Récemment nous avons étudiés les effets cytotoxiques et sélectifs des cellules cancéreuses d'une nouvelle classe d'inhibiteur du complexe mTORC1. mTORC1 est un complexe protéique activé de manière constitutive dans un grand nombre de tumeur solide et qui permet la croissance rapide des cellules cancéreuses. En effet la forte inhibition par cette nouvelle molécule (ICSN3250) est induite à des doses extrêmement faibles, sans influencer la viabilité des cellules non cancéreuses. La procédure de xénogreffe sous-cutanée chez la souris pour l'étude de l'effet de nouvelles molécules anti-cancéreuses est déjà couramment utilisée.

Dans le respect de la règle des 3R et afin de mener à bien cette étude, nous demandons pour réaliser cette expérience 90 souris maximum. Nous suivrons la croissance des tumeurs sous-cutanées d'une manière non-invasive au cours du temps en appliquant des modèles statistiques appropriés afin de réduire au maximum le nombre d'animaux mais également pour rendre cette expérience statistiquement significative. Il n'existe pas in vitro un système biologique de remplacement qui reproduise le comportement de cette potentielle molécule anti-cancéreuse.

Afin de respecter la notion de raffinement, un suivi quotidien des animaux par l'équipe de l'animalerie A2 en étroite coordination avec l'équipe de recherche de la naissance à la mort de la souris sera réalisé afin de pouvoir réagir au plus vite et limiter au maximum la souffrance de l'animal. Ainsi, cette surveillance quotidienne des animaux permettra de détecter les premiers signes d'inconfort ou de souffrance et d'euthanasier les animaux en cas d'atteinte de points limites. Les souris seront hébergées par fratrie à raison de 5 souris par cage dotée d'un nid afin d'enrichir leurs milieux et de limiter le stress des animaux.

9881 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 (procédure 1, 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, dans cette procédure, 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 (procédure 2, 72 souris). Enfin, dans la procédure 3 (216 souris), nous mesurerons l'influence d'un type cellulaire au niveau intestinal sur l'efficacité d'infection : 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.).

Dans la procédure 4 (240 souris), suite à l'obtention de résultats positifs pour la transmission du virus par voie orale aux souriceaux, et suite à la mise en évidence de présence de virus dans les glandes mammaires des souris femelles infectées (dans le cadre de la procédure 1), nous testerons la transmission directe du virus de la mère allaitante aux souriceaux suite à l'infection de la mère après sa mise-bas. Durant cette procédure, nous doserons également la présence de virus dans le lait maternel.

Ce projet comprend donc 4 procédures au cours desquelles un maximum de 768 souris seront utilisées (souriceaux, jeunes souris et souris femelles adultes). Les procédures 1, 3 et 4 seront de classe sévère (étude de pathogénicité), tandis que la procédure 2 sera de classe modérée (animaux mis à mort 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.

Deux formes de raffinement seront utilisées dans toutes les cages : des igloos ainsi que du coton afin notamment que les mères puissent construire des nids pour leurs portées de souriceaux. Tous les gestes techniques effectués sur les mères allaitantes et leurs portées ont été discutés avec la structure du bien-être animal et adaptés spécifiquement afin de garantir un maximum de bien-être pour tous les animaux durant toutes les expériences. Les expérimentateurs changeront également de gants entre les manipulations de chaque portée pour ne pas perturber la reconnaissance (par l'odorat) des souriceaux par leur mère.

9882 Le parasite utilisé dans le protocole est responsable d'une maladie dont la détection est obligatoire chez la femme enceinte. Afin de produire les réactifs de diagnostic nécessaires à ce dépistage, ce parasite est produit pour en extraire ses antigènes de surface. Le maintien en vie de ce parasite nécessite obligatoirement un passage in vivo qui, dans ce cas précis, se fait sur la souris.

Dans le cadre de la règle de 3R : Il est à noter que le reste de la production est réalisé in vitro ce qui a contribué partiellement au remplacement et à la réduction du nombre d'animaux utilisés annuellement (environ 4200 animaux prévus sur 3 ans soit 1400souris/an). Les conditions d'hébergements des souris satisfont au principe de raffinement avec l'utilisation de cages adaptées avec un enrichissement de leur environnement. Une surveillance quotidienne des animaux est mise en œuvre par un personnel habilité.

9883 L'objectif de la cryopréservation d'embryons est de se protéger contre la perte de stocks de rats précieux par échecs d'élevage, maladies ou en cas d'accidents (incendie, inondations). Cette technique permet aussi de réduire les coûts des laboratoires, car la cryoconservation d'une lignée peu utilisée revient moins cher que de maintenir la lignée sous forme respirante (réduire et remplacer) et garantit la disponibilité future d'un modèle animal.

Les embryons de rats sont produits par superovulation de rats femelles. Cette superovulation est pratiquée par injection d'hormones (pour augmenter le nombre d'embryons produits naturellement). Cette technique permet de réduire le nombre de femelles nécessaire pour la collecte du nombre d'embryons requis.

Ces embryons sont ensuite congelés et conservés dans des tankers d'azote liquide.

On considère usuellement qu'une lignée est cryoconservée lorsque 250 embryons sont congelés. Cela nécessite le recours à une vingtaine de femelles superovulées et 5 fondateurs pour réaliser la prestation.

Lorsqu'une lignée est demandée, une partie des embryons sont décongelés puis les survivants sont réimplantés dans des rates mères-porteuses, en pratiquant une petite intervention chirurgicale.

Entre 10 et 15 embryons sont réimplantés par femelle.

En fonction de la demande du chercheur plus ou moins d'embryons pourront être décongelés et réimplantés.

Les mères-porteuses utilisées sont d'excellentes mères, très calmes. Elles peuvent donner naissance à de grandes portées de nouveau-nés, ce qui permet de réduire significativement le nombre de femelles mère-porteuses utilisées.

Les ratons, nés des mères-porteuses, sont ensuite analysés pour vérifier que les petits possèdent le génotype attendu.

La réduction du nombre de rats utilisés et leur bien-être est une préoccupation permanente.

De l'enrichissement (bois à ronger, croquettes de nourriture et nids) est proposé dans les cages d'hébergement des animaux.

De plus, nous avons choisi de conserver les mâles vasectomisés (nécessaire pour la production de pseudogestantes) sur plusieurs mois, et de réutiliser les femelles pseudogestantes (non utilisées) afin de réduire au maximum le nombre d'animaux à utiliser par projet.

L'amélioration progressive des techniques permet sans cesse de répondre aux exigences de réduction et de raffinement.

On envisage une vingtaine de projets à cryoconserver par an, soit 400 femelles donneuses, 100 fondateurs, 80 pseudogestantes et 10 mâles vasectomisés par an.

Soit 2950 rats sur la durée du projet.

9884 L'activité au sein de la plateforme IRM petit animal nécessite des développements méthodologiques pour mettre au point des séquences IRM pour divers protocoles d'imagerie structurale, fonctionnelle et spectroscopique afin de répondre aux demandes variées des projets de recherche. L'IRM chez le petit animal consiste à acquérir des images des structures internes du cerveau (ou potentiellement d'autres organes) mais aussi de son fonctionnement et de son métabolisme énergétique. Pour les protocoles les plus fréquents cela implique une anesthésie des animaux au gaz pendant toute la durée des acquisitions.

Nous utiliserons sur 5 ans un total de 100 souris et 50 rats. 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 ; 2) raffinement, les procédures prennent en compte des temps de récupération et des nombres d'essais visant à réduire le stress et la fatigue des animaux ; 3) remplacement, les études in vitro et sur animaux invertébrés ne permettent pas l'étude de comportements complexes ; le rongeur est donc une des espèces les plus appropriées pour ce type d'étude.

9885 Actuellement, les voies muqueuses sur lesquelles sont appliquées des principes actifs sont les voies d'administration préférées des médicaments (buccale, gastro-intestinale, nasale, vaginale...), en comparaison avec les voies parentérales (injections intraveineuses, intramusculaires, sous-cutanées...). Cependant, la conception de formulations capables de contrer la dilution par les fluides physiologiques et d'éviter leur élimination par le mucus continue de représenter un défi à relever. Les nanoparticules (NPs) polymères en tant que transporteur de principe actif ont déjà montré leur capacité à résoudre partiellement certains aspects de ces problèmes, notamment grâce à leur petite taille et à leur surface mucoadhésive. Cependant, bien que les effets de la taille des NPs polymères et de leurs propriétés de surface aient été largement étudiés, il y a un manque indubitable de connaissances concernant l'effet de la morphologie des NPs sur leurs comportements vis-à-vis des muqueuses. Ainsi, la stratégie originale proposée ici est de considérer la forme des NPs comme un nouveau paramètre pour concevoir les nanomédicaments du futur, administrables par les voies muqueuses.

Notre objectif est de concevoir des NPs non-sphériques, de morphologie et de propriétés de surfaces contrôlées et de comprendre leurs comportements après administration par les voies muqueuses en étudiant : (i) leur diffusion dans les fluides biologiques, (ii) leur diffusion à travers le mucus, (iii) leur interaction avec les constituants du mucus, (iv) leur capture par les cellules épithéliales et leur passage trans-muqueux.

Des résultats préliminaires ont montré (i) la faisabilité de la fabrication des NPs avec la possibilité de contrôler à la fois la morphologie, la taille et la surface, (ii) que des NPs de forme allongée et aplatie avaient une mobilité différente dans l'eau que des NPs sphériques donc atteindraient plus rapidement les muqueuses.

Basé sur des concepts nouveaux et non conventionnels, ce projet multidisciplinaire et ambitieux combine des approches fondamentales avec une vision appliquée des nanotechnologies dans le domaine de la santé. En fonction de leur devenir dans les muqueuses, différents domaines d'application peuvent être envisagés. Par exemple, des NPs avec un long temps de résidence dans le mucus et un faible passage à travers la muqueuse peuvent être utilisés pour des actions locales pour le traitement de maladie touchant les muqueuses. A contrario, des NPs capables de diffuser à travers les muqueuses peuvent être adaptées pour des traitements systémiques.

Les chances de succès de ce projet sont élevées grâce aux preuves de concepts, déjà démontrées, de faisabilité de la préparation des NPs.

Cette étude se focalisera sur la voie d'administration orale et le devenir des NPs dans l'intestin grêle qui est le site le plus important d'absorption des médicaments. Différentes formulations de NPs avec des morphologies, des propriétés de surface et de tailles différentes, seront évaluées in vivo.

Des études préliminaires seront réalisées in vitro sur des cellules sécrétant du mucus et ex vivo sur de l'intestin de rat afin de sélectionner les NPs les plus prometteuses et diminuer ainsi le nombre de formulations testées in vivo. Ensuite, la pharmacocinétique et le temps de résidence de ces NPs dans le tube digestif seront évalués in vivo par imagerie optique grâce à des NPs marqués avec un fluorochrome qui permettra de suivre et quantifier la fluorescence. De même, en cas de passage à travers la muqueuse intestinale, la biodistribution dans les principaux organes sera évaluée en imagerie. L'étude du passage des NPs in vivo est nécessaire car il permet de prendre en compte des paramètres primordiaux non modélisables in vitro que sont la dilution par les fluides intestinaux, la présence de mucus et son renouvellement permanent. Les contraintes subies par les animaux seront légères. Ils recevront le traitement par voie orale à l'aide d'une sonde adaptée (administration unique ou sur 7 jours). Le gavage sera réalisé sur animal vigile par un personnel expérimenté. L'exploration du devenir des NPs se fera par une méthode non invasive qu'est l'imagerie optique. L'utilisation de l'imagerie sous anesthésie permettra également de réduire considérablement (d'au moins un facteur de 10) le nombre d'animaux utilisés car elle permet l'optimisation de l'utilisation de chaque animal avec un recueil de données dans le temps pour chaque sujet, chaque animal étant son propre contrôle.

Les études de pharmacocinétique seront effectuées chez la souris et les études d'accumulation dans le tube digestif et de biodistribution chez le rat. Nous prévoyons d'utiliser 366 animaux (222 souris et 144 rats).

9886 Le développement de méthodes permettant de manipuler le système immunitaire à des fins thérapeutiques dans le cadre de traitements anti-tumoraux a été l'objet de nombreux efforts de recherche dans les dernières décennies. Le système immunitaire dispose de plusieurs possibilités pour identifier et cibler les cellules tumorales. Parmi eux, l'apparition de lymphocytes T cytotoxiques capables de reconnaître et d'éliminer les cellules tumorales constitue un mécanisme clef. Cette reconnaissance s'effectue par le biais de molécules appelées complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). En effet, ces molécules, exprimées par la plupart des cellules, ont la capacité de capturer et d'exposer à la surface de la cellule des peptides (fragments de protéines), reflétant la composition protéique de la cellule à un moment donné. Lorsqu'il s'agit de protéines du « soi », présentes normalement dans la cellule, le système immunitaire les ignore. En revanche, lorsqu'il s'agit de peptides dérivés de virus (« non-soi »), le système immunitaire est activé, et est capable d'éliminer les cellules qui expriment ces peptides du non-soi. Les cellules cancéreuses font en théorie partie du « soi ». Cependant, l'instabilité génomique caractéristique de cellules tumorales se traduit par

l'accumulation de mutations, qui peuvent conduire à l'apparition de peptides « spécifiques » des cellules cancéreuses, et par conséquent visibles par le système immunitaire. Il est toutefois essentiel de noter que la très grande majorité des cancers développent des mécanismes très efficaces qui inhibent la réponse immunitaire.

Les récentes années ont vu l'entrée en clinique des inhibiteurs de checkpoint, molécules utilisées dans le traitement de plusieurs cancers chez l'homme dans le cadre d'une approche appelée immunothérapie. Ces molécules fonctionnent en bloquant une partie des mécanismes immunosuppresseurs des tumeurs, et permettent donc au système immunitaire de recommencer à fonctionner, et d'éliminer les cellules cancéreuses. Le développement de ces molécules constitue une avancée majeure dans le traitement de cancers chez l'homme. En effet, elles démontrent une efficacité chez des patients résistants à d'autres types de traitement. Cependant, les inhibiteurs de checkpoint ne fonctionnent que dans 20 à 25% des patients qui sont traités de cette manière. La compréhension des mécanismes expliquant cette efficacité variable est actuellement l'objet d'efforts considérables de la communauté scientifique. Tout comme l'identification de molécules avec lesquelles les inhibiteurs de checkpoint pourraient être combinés pour augmenter leur efficacité.

Une question majeure restant ouverte est celle de la nature des peptides exprimés par les cellules tumorales visibles par le système immunitaire. Ce que nous voulons tester dans ce projet, c'est l'hypothèse selon laquelle les cellules tumorales pourraient être vues par le système immunitaire non seulement par le biais de peptides mutés (non-soi), mais aussi par le biais de peptides dérivés de rétrovirus endogènes. Les rétrovirus endogènes constituent 40% du génome. Chez certains patients humains, une meilleure efficacité des inhibiteurs de checkpoint a été associée à une expression élevée de rétrovirus endogènes. Cependant, les auteurs n'ont pas analysé les peptides qui étaient reconnus par le système immunitaire chez ces patients.

Pour tester cette hypothèse, nous générerons par le biais de la technologie CRISPR/Cas9 des lignées cancéreuses inactivées pour certaines molécules impliquées dans la répression des rétroéléments endogènes (en inactivant ces molécules, nous nous attendons à voir une augmentation de l'expression de ces rétroéléments). La technologie CRISPR/Cas9 permet de tronquer un gène d'intérêt et d'abolir son expression. Ces lignées cancéreuses ont la caractéristique de pouvoir être implantées dans des souris par une injection sous-cutanée, ce qui rend facile le suivi de croissance tumorale. Nous évaluerons si l'inactivation de ces gènes (et l'augmentation de l'expression de rétroéléments endogènes) améliore la réponse des souris à un traitement par inhibiteurs de checkpoint.

Ensuite, par le biais de séquençage de nouvelle génération, nous identifierons des peptides dérivés de rétrovirus endogènes, et nous testerons si la vaccination contre ces peptides candidats peut protéger les souris contre la croissance tumorale.

Enfin, nous tenterons d'identifier des molécules, utilisables chez l'homme, capables de récapituler l'effet de la réactivation des rétrovirus endogènes observés sur l'efficacité des inhibiteurs de checkpoint. Par conséquent, ce projet permettra d'ouvrir de nouvelles pistes pour améliorer encore l'efficacité de ces thérapeutiques révolutionnaires.

Dans le cadre de ce projet, nous utiliserons des souris C57BL6 pour réaliser des greffes de tumeurs par voie sous-cutanée. En effet, après plusieurs étapes de validation in vitro, il sera nécessaire de passer à des modèles animaux. Dans le cadre de ce projet, prévu pour durer 5 ans, nous prévoyons d'utiliser au maximum 2220 souris.

Conscients du besoin de remplacer autant que possible l'usage d'animaux par des méthodologies alternatives, nous nous appuyerons autant que possible sur des approches in vitro. Nous travaillerons aussi en étroite collaboration avec des bio-informaticiens, pour affiner autant que possible nos analyses avant de commencer les expériences sur les souris. Afin de minimiser au maximum le nombre d'animaux utilisés au cours de ce projet, nous nous attacherons à constituer des groupes expérimentaux aussi réduits que possible permettant toutefois d'obtenir des résultats interprétables statistiquement. Nous nous attacherons aussi à analyser de chaque expérience impliquant des animaux autant de paramètres que possible, permettant ainsi d'établir des corrélations potentiellement importantes. Enfin, pour chaque expérience, une feuille de score détaillée sera fournie aux expérimentateurs, leur permettant d'évaluer avec précision le point limite de l'expérience. En accord avec les recommandations internationales dans le domaine de la

cancérologie, les animaux seront suivis quotidiennement afin d'assurer leur bien-être et les expérimentations seront interrompues avant la souffrance des animaux.

9887 Projet :

Nos données préalables chez la souris montrent que la sur-/sous-nutrition durant la lactation est suffisante pour programmer la sécrétion de l'hormone de croissance (GH). Ceci programme la croissance postnatale de l'organisme mais influe également sur l'émergence des pathologies adultes. En effet, la dérégulation de la GH semble être un facteur aggravant dans l'émergence des pathologies cardio-métaboliques (résistance à l'insuline, obésité, hypertension artérielle). Nos données indiquent que cette programmation est réalisée par les hormones nutritionnelles (IGF-I, Leptine) qui stimulent le développement des neurones GHRH, principal stimulateur de la sécrétion de la GH.

En outre, nous avons mis en évidence l'installation d'une résistance des neurones GHRH à la stimulation par les hormones nutritionnelles recueillie à partir de souriceaux restreints. De manière intéressante, les souris ayant une expression amoindrie pour une protéine nommée Delta Like Non-Canonical Notch Ligand 1 (DLK1) présentent un retard de croissance et un défaut d'accumulation d'IGF1 semblable aux souris restreintes. DLK1 est fortement exprimé au niveau de l'hypothalamus et plus particulièrement dans la région où sont localisés les neurones GHRH. DLK1 pourrait ainsi être un médiateur de la restriction nutritionnelle sur le développement des neurones GHRH.

Le protocole soumis est conçu pour déterminer chez la souris i) Est-ce que DLK1 est régulé par la nutrition au niveau sanguin et au niveau hypothalamique, ii) Quels types cellulaires hypothalamiques expriment DLK1 (neurones, ou autres types cellulaires), iii) Est-ce que les neurones GHRH expriment DLK1.

Type d'animaux : souris *mus musculus*

Nombre d'animaux : Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 386 souris expérimentales pour une durée maximale de 5ans. 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.

Réduction : Nous limitons au maximum le nombre d'animaux par groupe de façon à obtenir des résultats statistiquement fiables. A cause des variabilités inter-animales et intergroupes, un nombre trop restreint d'animaux engendrerait des résultats trop variables et non valides. Compte tenu des données de la littérature (variabilité attendue) et des effets espérés, un test de puissance statistique a été utilisé pour déterminer le nombre minimum d'animaux nécessaire pour cette étude.

Raffinement : Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des procédures ont été mise au point afin de permettre une interprétation fiable dans le respect du bien-être animal, en limitant la douleur et le stress. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation, les animaux disposent de nourriture et d'eau *ad libitum*. Le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification ou de maison de type igloo. Nous nous efforçons à chaque instant de raffiner nos procédures afin de garantir le bien-être des animaux en cours de procédure grâce à une surveillance attentive et des soins adaptés.

9888 Ce projet a pour but d'apporter de nouvelles connaissances concernant la formation des cellules reproductrices femelles. Notre intérêt est fondamental mais nos résultats pourraient permettre de mieux comprendre certaines stérilités chez la femme.

Au cours de la croissance des ovocytes, le complexe de protéines qui contrôle l'initiation de la transcription est remplacé par un autre complexe encore peu caractérisé. Notre projet est de caractériser ce complexe. Nos études biochimiques ont montré que ce complexe est différent du complexe retrouvé dans tous les autres tissus et ne contiendrait pas certaines protéines. Nous

voulons vérifier notre hypothèse en étudiant les ovocytes dans des souris mutantes pour les gènes codant pour deux de ces protéines. Ce projet nécessite l'utilisation de 20 animaux.

- remplacement : nous utilisons le modèle souris parce que nous utilisons des souris portant des mutations conditionnelles pour nos gènes d'intérêt. D'autre part, il n'y a pas à ce jour de système in vitro vraiment efficace permettant la production et la croissance d'ovocytes.

- réduction : notre but est de vérifier que l'absence des protéines d'intérêt n'affecte pas la croissance ovocytaire. Afin de réduire le nombre d'animaux, nous voulons analyser la production d'ovocyte par stimulation ovarienne, permettant d'augmenter significativement le nombre d'ovocytes par souris. D'autre part, le nombre de souris a été calculé pour permettre une analyse statistique.

- raffinement : l'objet de cette saisine est la stimulation ovarienne qui consiste en deux injections intrapéritonéales. Cette procédure n'est pas douloureuse et est limitée dans le temps puisque les ovocytes sont récupérés 3 jours après le début de la procédure. Cette procédure ne nécessite pas d'isoler les femelles et permet de maintenir des conditions d'élevage normales ainsi que les liens sociaux entre les animaux.

9889 L'insuffisance cardiaque est la pathologie caractérisée par l'incapacité du cœur à assurer un débit sanguin nécessaire au fonctionnement de l'organisme. Les thérapeutiques majeures actuelles pour le traitement de l'insuffisance cardiaque sont (i) la transplantation cardiaque, (ii) la prothèse cardiaque totale et (iii) l'implantation d'un dispositif d'assistance ventriculaire. Une contrainte majeure de ces techniques est la nécessité de traitements antirejet ou anticoagulant qui sont connus pour entraîner de fortes complications médicales.

Notre équipe souhaite explorer une piste peu connue du domaine des assistances cardiaques nommée Compression Cardiaque Directe (Direct Cardiac Compression en anglais ou DCC). Le concept des DCC consiste à appliquer un effort sur la paroi externe du cœur afin d'améliorer l'éjection du sang par ce dernier et ainsi de restaurer le débit cardiaque. Les avantages majeurs présentés par ce type de dispositif sont de ne pas présenter de contact direct avec le compartiment sanguin du patient et de ne pas nécessiter de remplacement complet ou partiel d'un organe. Au travers de cette étude, nous souhaitons valider l'hypothèse selon laquelle un dispositif de ce type serait à même de restaurer le débit cardiaque d'un patient souffrant d'insuffisance cardiaque, et ce en adaptant le taux d'assistance de façon continue à la gravité de la pathologie. De ce fait, l'appareil ne dispensera que l'aide nécessaire à l'organe.

L'adaptation à l'environnement physiologique direct du cœur nous conduit à réaliser cette étude sur un modèle animal où toutes les contraintes seront présentes (impossibilité de remplacement). Le recours au modèle porcin est justifié par les similitudes anatomiques, physiologiques et hémodynamiques avec le cœur humain. Ce projet aura recours à 9 cochons adultes (poids compris entre 50 et 60 kg).

Ce geste permettra d'observer si l'implantation occasionne des modifications des paramètres mesurés chez le sujet sain. L'assistance sera ensuite activée, afin de confirmer le maintien des paramètres hémodynamiques sur un organe sain assisté. L'insuffisance cardiaque ischémique aiguë sera réalisée de façon médicamenteuse (esmolol) ou chirurgicale (ligature de l'artère interventriculaire antérieure). Une fois l'état pathologique du sujet confirmé, l'assistance sera de nouveau activée. A la fin de cette expérimentation, le tissu cardiaque sera analysé par une étude histologique macro et microscopique.

Nous avons établi des points limites (modification des paramètres cardiaques et respiratoires indiquant un réveil, une douleur ou un inconfort de l'animal) qui ne seront pas dépassés grâce aux procédures médicamenteuses disponibles au laboratoire (analgésie contrôlée, anesthésie chirurgicale). Ce modèle est déjà en place dans notre structure permettant de réduire le nombre d'animaux. Ainsi, 9 animaux sont nécessaires permettant ainsi une étude statistiquement exploitable.

Les conditions d'hébergement (enrichissement du milieu), de soins (établissement points limites) et surtout les méthodes utilisées (opérations sous anesthésie générale, analgésie contrôlée) qui sont des méthodes dérivées directement de la pratique clinique chez l'homme permettent ainsi un raffinement de la méthodologie.

9890 Les récents progrès en immunothérapie anti-cancéreuse font suite à la découverte de la capacité du système immunitaire à contrôler efficacement la croissance de nombreuses tumeurs et à les éliminer dans certains cas. Le but du projet est de mieux comprendre comment les cellules myéloïdes (la lignée des cellules myéloïdes est produite dans la moelle osseuse et donne naissance à plusieurs types de cellules sanguines dont les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques) interagissent avec les cellules tumorales au sein des tumeurs dans l'idée de manipuler ces cellules à des fins thérapeutiques. On sait que pour plusieurs types de tumeurs, la présence de macrophages au sein de la tumeur constitue un mauvais pronostic. Néanmoins la nature des interactions entre les cellules myéloïdes recrutées et les cellules tumorales restent à établir. En utilisant un modèle de tumeurs de souris chez des souris différentes du point de vue génétique, nous chercherons à comprendre comment les cellules myéloïdes sont recrutées au niveau de la tumeur et comment peut-on modifier leurs propriétés pour obtenir des effets thérapeutiques bénéfiques.

Ce projet découle en partie de résultats obtenus *in vitro* à l'aide notamment de lignées cellulaires en culture. Mais nos hypothèses doivent être évaluées dans un système plus physiologique représentant un organisme vivant intégré tel que la souris. De plus, certaines expériences à visée préclinique sont indispensables pour tester l'efficacité, le mécanisme d'action ainsi que la toxicité éventuellement associée aux traitements envisagés. 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 menons en parallèle des expériences réalisées *in vitro* pour aborder les mêmes questions au moyen de cultures de cellules tumorales en 3D auxquels sont ajoutés des cellules myéloïdes. Ceci a pour but de réduire à terme les expériences *in vivo*. Néanmoins, même si ce type d'études peut apporter des informations mécanistiques et permettre de définir certains paramètres, il reste indispensable pour confirmer la réalité de nos observations de les étendre aux modèles *in vivo* en utilisant la puissance de la génétique chez la souris. De plus, l'idée de manipuler les cellules myéloïdes associées aux tumeurs par différents traitements pour induire un effet antitumoral doit être testée *in vivo* avant d'envisager un passage à la clinique.

Le nombre total de souris qui seront utilisé s'élève à 543. Les effectifs évoqués représentent le nombre minimum d'animaux nécessaires pour obtenir des résultats statistiquement analysables. 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 critères bien précis. Dans un souci de raffinement, toutes les mesures seront prises pour éviter le stress et la douleur des animaux. Ainsi, les procédures chirurgicales sont réalisées sous anesthésie générale à l'isoflurane avec maintien de la température corporelle grâce à des tapis chauffants.

9891 Les précédents travaux de notre laboratoire montrent que le gène suppresseur de tumeurs p53 joue un rôle clé dans le métabolisme des cellules normales et que sa dérégulation contribue à la reprogrammation métabolique des cellules cancéreuses. Le projet proposé vise à comprendre les fonctions métaboliques d'un acteur clé de cette voie : la protéine MDM2, fréquemment surexprimée dans de nombreux types de cancers humains.

Les fonctions métaboliques de MDM2 dans le muscle squelettique seront évaluées au travers de tests d'endurance permettant d'évaluer l'activité musculaire et couplés à un régime alimentaire spécifique. Ces tests seront réalisés sur différentes cohortes d'animaux décrites en détails dans ce document dans le respect strict de la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner). Au total, 240 animaux seront utilisés. Le suivi des animaux sera réalisé selon les règles en vigueur décrites dans la directive 2010/63 (surveillance quotidienne, soin et suivi, compétence et responsabilité du personnel, prise en charge de la douleur, etc...). Les dispositions prises pour l'application de la règle des 3R sont les suivantes :

- « Réduire » le nombre d'animaux en expérimentation. Nous avons prévu d'utiliser un nombre minimum mais suffisant d'animaux pour obtenir une puissance statistique dans le traitement de nos résultats, en intégrant le retrait prévisible de certains animaux de ces procédures si ils développent spontanément des tumeurs.

- « Raffiner » la méthodologie utilisée, ce qui implique la notion de points limites (critères d'interruption, ou "end-points") : nous allons porter une attention particulière au bien-être de nos animaux avec un suivi quotidien des animaux.
- « Remplacer » les modèles animaux : nous utiliserons le modèle souris comme modèle animal afin d'étudier le rôle de MDM2 dans l'activité musculaire chez les mammifères car la physiologie musculaire de la souris se rapproche suffisamment de la physiologie humaine et du fait de l'existence de modèles génétiquement modifiés pour les gènes d'intérêts (Mdm2; p53). Il n'existe pas de modèle cellulaire reproduisant nos procédures expérimentales.

9892 Chaque étude de ce projet a pour objectif principal d'étudier le devenir d'une molécule, candidat-médicament, chez le cobaye, lorsque cette espèce est utilisée au cours du développement préclinique de cette molécule (pharmacocinétique).

Pour cela, au cours de chaque étude, des prélèvements sanguins répétés sont réalisés chez l'animal vigile ou transitoirement anesthésié après l'administration du candidat-médicament et éventuellement du véhicule qui a servi à préparer la formulation de la molécule testée ou un produit de référence.

Ces prélèvements de sang sont utilisés pour mesurer dans le temps la concentration du candidat-médicament administré et/ou de ses métabolites et éventuellement la concentration de différents marqueurs biologiques pertinents.

Le nombre prévisionnel maximum d'animaux est de 900 cobayes sur 5 ans.

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

- Remplacement : Dans le cadre du développement de nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez le cobaye car il n'existe pas de méthode de substitution (in vitro ou in silico) pour étudier la pharmacocinétique d'un candidat-médicament. Or, avant toute administration à l'homme, l'animal constitue un passage obligatoire pour l'évaluation de l'efficacité, la toxicité et la pharmacocinétique d'un candidat-médicament. A ce jour, le rongeur cobaye est l'une des espèces qui est la plus adaptée à ce type de modèle d'étude.

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

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

- 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'éventuel signes cliniques
- la détermination des points limites
- le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire.

9893 Dans le cadre de la recherche de nouveaux traitements visant les pathologies cardiaques, un gène a été mis en évidence récemment pour son implication dans la régulation du rythme cardiaque. Afin de déterminer de manière fine l'évolution des dommages éventuels liés à son absence ainsi que le rôle de chaque partie de la protéine, plusieurs lignées de souris génétiquement modifiées ont été générées, porteuses chacune d'une mutation différente altérant la protéine.

Nous chercherons à caractériser l'impact de chacune des modifications génétiques sur l'évolution de la fonction cardiaque chez les animaux, afin de comprendre l'implication de chaque partie du gène et de la protéine résultante.

Nous pratiquerons une échographie et un électrocardiogramme, de manière mensuelle, sur des animaux âgés au début du projet de 10 semaines et qui seront suivis jusqu'à plus de 40 semaines. Par ailleurs, un prélèvement sanguin sera réalisé en fin de protocole pour suivre les marqueurs sanguins liés à la fonction cardiaque.

Les lignées actuellement disponibles ne présentent pour l'instant aucun phénotype dommageable sévère, ni mortalité durant le vieillissement.

Cette étude consiste donc dans une caractérisation fine d'un gène potentiellement impliqué dans les troubles du rythme cardiaque, et ne disposant actuellement d'aucune donnée précise sur le rôle de chaque sous-unité de la protéine codée par ce gène dans la littérature scientifique.

Cette étude nécessite l'utilisation d'un modèle animal et ne peut être remplacée par une méthode alternative, du fait de la nécessité de travailler sur le système cardiaque dans son ensemble.

Nous utiliserons dans chacun de ces protocoles 24 souris, 12 animaux contrôles et 12 animaux génétiquement modifiés. Au total, 5 lignées pourront être générées, nous pourrions donc être amenés à caractériser 5 cohortes de 24 animaux, pour un total de 120 animaux.

Ces 5 lignées correspondent à 2 mutations différentes du gène, qui pourront être croisées entre elles pour tester l'impact des combinaisons de mutations sur la mutation.

Les lignées seront testées dans un premier temps avec deux copies de la mutation ; mais si l'absence d'une copie normale du gène génère des animaux ayant des symptômes sévères, nous étudierons des animaux avec une seule copie de la mutation.

Ces effectifs nous permettront d'obtenir des données suffisamment robustes tout en minimisant l'utilisation d'animaux, en répétant les tests sur les mêmes souris, cela étant possible du fait de l'utilisation de tests non invasifs comme l'échographie, sous anesthésie gazeuse.

Nous n'attendons aucune souffrance ou risque de mortalité, néanmoins les animaux seront surveillés quotidiennement, et de manière plus proche encore durant les anesthésies gazeuses afin de respecter le bien-être de nos animaux.

L'anesthésie gazeuse pratiquée durant les tests répétés ne présente aucune contre-indication à un usage répété, notamment espacé de plus de 2 semaines entre chaque exposition.

9894 1-Objectif scientifique du projet :

Pour étudier la biologie du cancer et l'efficacité de nouvelles approches thérapeutiques, les modèles animaux les plus pertinents et de plus en plus utilisés consistent à greffer un fragment de tumeur de patient (PDX pour "Patient Derived Xenograft) chez une souris immunodéprimée (présentant un système immunitaire fortement diminué voire inexistant). Cette approche permet de disséquer le comportement de la tumeur dans un environnement complexe. Cependant, ce type de modèle ne permet pas d'investiguer les interactions entre la tumeur et les cellules du système immunitaire, qui sont désormais reconnues comme jouant un rôle essentiel dans la modulation de la croissance tumorale et peuvent être manipulées à des fins thérapeutiques. Pour améliorer la pertinence du modèle, il est possible de reconstituer un système immunitaire humain dans des souris immunodéprimées par le transfert de cellules souches hématopoïétiques (CSH) CD34+ avant de greffer une tumeur de patient, mais les origines hétérologues (c'est à dire que la tumeur et les cellules immunitaires proviennent de patients ou d'organismes différents) des cellules immunitaires et des cellules tumorales limitent la pertinence de ces approches en immuno-cancérologie.

Depuis 2006, il est possible de dériver des cellules souches pluripotentes (capables d'engendrer des cellules spécialisées) à partir de cellules différenciées (spécialisées) de patients. Ces cellules autologues (c'est à dire provenant du même patient), appelées iPS (pour cellules souches pluripotentes induites), présentent un très fort potentiel de différenciation et donc un intérêt majeur en médecine régénérative. Des publications récentes rapportent la différenciation de ce type de cellules in vivo, au sein de tératomes (tumeurs bénignes) en CSH capables de reconstituer un système immunitaire chez des souris immunodéprimées.

Dans ce contexte, notre projet vise à développer des modèles de PDX présentant un système immunitaire autologue pour étudier les interactions entre la tumeur et le système immunitaire du patient et à terme tester de nouvelles stratégies d'immunothérapie. Pour cela, nous proposons une stratégie expérimentale en 2 étapes :

- L'injection de cellules iPS humaines, préparées à partir de cellules sanguines d'un patient, chez la souris immunodéficente afin de former un tératome au sein duquel nous pourrions isoler des CSH CD34+ purifiées.

- Les CSH CD34+ purifiées seront transférées chez de nouvelles souris immunodéficientes pour reconstituer un système immunitaire avant l'implantation d'un fragment de tumeur du même patient afin de générer un modèle PDX avec un système immunitaire autologue.

Cette approche devrait permettre de générer un modèle murin pertinent et innovant, permettant l'étude in vivo des interactions entre la tumeur et son environnement immunitaire et l'évaluation de stratégies thérapeutiques ciblant le système immunitaire (immunothérapie).

2- Retombées attendues

Les modèles murins PDX dans lesquels les tumeurs sont greffées chez des souris immunodéficientes sont informatifs pour suivre le développement tumoral in vivo mais inadaptés pour comprendre les interactions entre le système immunitaire et les cellules tumorales. Dans ce contexte, nous pensons que l'approche proposée dans ce projet pourrait constituer une avancée majeure en cancérologie en permettant d'étudier dans un modèle autologue les interactions cellules tumorales/cellules immunitaires.

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

Les modèles PDX sont à ce jour les modèles les plus pertinents pour étudier les tumeurs humaines dans un environnement complexe in vivo. Par ailleurs, à notre connaissance, seul le passage par la formation de tératome in vivo permet la différenciation des cellules iPS en CSH fonctionnelles ; les approches de différenciation in vitro (co-culture des iPS avec des lignées stromales et des cytokines, reprogrammation.) ne génèrent pas de CSH multipotentes capables de reconstituer efficacement un système immunitaire après greffe chez la souris.

Dans chaque bloc d'expérimentation, le nombre de souris a été réduit au minimum nécessaire pour répondre à la question posée sans ambiguïté.

Les techniques utilisées minimiseront la souffrance animale (utilisations d'anesthésique et d'analgésique). Un suivi adapté des animaux et la définition de points limites précoces et prédictifs de l'apparition d'un mal être permettent de limiter au maximum toute souffrance animale.

4- Nombre total d'animaux inclus dans ce projet

326 souris immunodéficientes NSG seront utilisées pour réaliser le projet.

9895

Des caractères morphologiques extravagants ou des colorations vives présentant une grande variabilité interindividuelle intra-spécifique sont largement répandus au sein du royaume animal. Comprendre leur fonction et évolution est une question ayant occupé le champ de la biologie évolutive depuis Darwin. Une partie du problème (et de la solution) réside dans le fait que de tels caractères peuvent apparaître néfastes à la valeur adaptative des individus les arborant puisqu'ils sont souvent coûteux à produire et maintenir, requérant d'y investir du temps, de l'énergie et des ressources qui ne peuvent alors être allouées à d'autres fonctions vitales. Par ailleurs de tels signaux peuvent rendre les individus plus voyants et susceptibles à la prédation. Par conséquent, la qualité de ces signaux (ornements) pourrait être un bon indicateur de la condition du poisson, comme par exemple sa valeur reproductive, et être directement transmis à ses congénères via une information visuelle. Tandis que l'hypothèse de condition-dépendance a largement été étudiée chez les oiseaux, moins d'études se sont focalisées sur les poissons, et en particulier sur le fait que la coloration puisse informer sur la condition/santé des individus. Ce projet a pour but de tester l'hypothèse de la condition-dépendance de la couleur chez une espèce d'importance commerciale (aquaculture et pêche): la dorade royale (*Sparus aurata*). La dorade est dotée d'ornements de couleur vive pouvant être utilisés dans des contextes sociaux ; néanmoins aucune information n'est actuellement disponible sur les processus physiologiques sous-jacents à leur production/maintenance. L'ensemble de ce projet testera, par des approches corrélatives et expérimentales, si la coloration (1) reflète la condition, l'immunité, l'efficacité métabolique, le stress oxydatif, et le stress endocrinien des individus; (2) peut être utilisée pour prédire des traits d'histoire de vie incluant l'âge, le sexe, l'âge à maturité sexuelle, et les performances reproductives; et (3) est conditionnée par les ressources alimentaires (notamment présence de pigments caroténoïdes). Outre les questions de biologie évolutive, ceci permettra d'informer directement les pratiques d'aquaculture sur la réalisation d'élevages en bonne santé et esthétiques, mais aussi d'étudier des différences phénotypiques et de renseigner sur le cycle de vie de cette espèce emblématique en milieu sauvage. Ce dossier éthique couvre les procédures d'expérimentations sur animaux prévues dans ce projet :

1) Anesthésie, analyse de couleur par spectrométrie, prise d'un échantillon de sang

2) Mesure de traits de métabolisme par respirométrie statique

3) Mesure de traits de performance métabolique par respirométrie en couloir de nage

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

- Remplacer : Ces études, qui impliquent la mesure de coloration et de métabolisme énergétique in vivo, doivent être réalisées sur des animaux.

- Réduire : Pour les mesures de couleurs en spectrométrie (n = 80) ainsi que pour les expériences de respirométrie in vivo (n = 36 individus choisis parmi les n = 80 étudiés pour leur coloration), le nombre de individus utilisé est le minimum nécessaire afin de réaliser des analyses au pouvoir statistique suffisant et statuer sur nos questions.

- Raffiner : Tout a été mis en place dans le cadre des procédures pour limiter la souffrance et le stress des animaux pendant les mesures de leur coloration, par des procédures d'anesthésie optimales. Les mesures de coloration par spectrométrie sont réalisées en routine sur de nombreuses autres espèces (Mammifère, oiseaux...), l'utilisation de cette technique est indolore avec unique contrainte pour les poissons d'être maintenu hors de l'eau sous anesthésie pour une durée de 2 minutes, techniques largement maîtrisés et utilisés par l'ensemble de la communauté scientifique, de la pisciculture, ainsi que notre équipe technique. En dehors de ces mesures, les poissons seront conservés dans la station de recherche en pisciculture, à une densité optimale dans des bassins externes isolés des perturbations humaines, avec une alimentation journalière ad-libitum. Les procédures de respirométrie in vivo sont bien établies chez les poissons. L'objectif des protocoles est de limiter au minimum la souffrance et le stress des animaux, avec capture des poissons sous l'eau et placement dans les respiromètres sans exposition à l'air, suivi par un temps minimal d'acclimatation de 2h. Les poissons sont à l'abri de toute nuisance visuelle et sonore pendant la récupération et les expériences. Cela permet d'obtenir des mesures physiologiques valides et fiables, qui ne sont pas influencées par un état de souffrance, stress ou agitation de l'animal.

9896

Le projet vise à mettre au point une nouvelle technologie optique permettant de contrôler optiquement l'activité des neurones, c'est-à-dire les photo-activer, à l'échelle de la cellule individuelle, en profondeur dans le cerveau. Pour cela nous concevons et construisons de nouveaux microscopes utilisant des lasers infrarouges et des systèmes holographiques permettant d'illuminer spécifiquement des cellules individuelles choisies en profondeur dans le cerveau, et ce avec une très grande précision spatio-temporelle. Cette nouvelle technologie est prometteuse pour comprendre les fonctions du cerveau. En effet, en conditions physiologiques ou pathologiques, ces fonctions mettent en œuvre l'activation éparsée de neurones distribués dans des réseaux tridimensionnels, en profondeur dans le cerveau. La compréhension du fonctionnement de ces réseaux nécessite de comprendre le rôle exercé par l'activité d'un ou plusieurs neurones sur l'ensemble du réseau et les conséquences fonctionnelles de cette activation. A l'heure actuelle les techniques permettant de photo-activer le cerveau à l'échelle du neurone ne peuvent être appliquées qu'en surface et ne peuvent donc pas être utilisées dans l'immense majorité des réseaux du cerveau qui sont tridimensionnels et en profondeur. Nos travaux apporteront un nouvel outil qui sera utilisé in vivo et que nous devons donc tester in vivo. Nous les testons sur des neurones génétiquement modifiés pour pouvoir d'une part être photo-activés à une longueur d'onde donnée, et d'autre part émettre un signal lumineux à une autre longueur d'onde lorsqu'elles sont activées. Ces tests sont réalisés en collaboration avec des laboratoires spécialisés en génie génétique. Notre modèle animal est la souris adulte car c'est le principal modèle utilisé par les laboratoires de recherche pour étudier le fonctionnement du cerveau dans des conditions physiologiques et pathologiques. Pour modifier génétiquement le cerveau des souris nous injecterons des virus non pathogènes portant les gènes des protéines d'intérêt. Nous garderons ensuite les animaux 4-8 semaines afin que ces protéines aient le temps de s'exprimer. Nous fixerons certains animaux afin d'étudier leur distribution dans le cerveau. Nous testerons tout d'abord la photo-activation ex vivo pour mettre au point les différents paramètres en jeu, comme la puissance lumineuse à utiliser pour photo-activer, la durée d'exposition, la photo-toxicité. Nous réaliserons ensuite des expériences in vivo chez la souris anesthésiée afin de contrôler que les paramètres précédemment mis au point permettent de photo-activer efficacement les neurones in vivo et nous contrôlerons cette activation en mesurant l'émission de lumière induite dans les cellules photo-activées. Enfin, nous utiliserons ces techniques afin de mieux comprendre le fonctionnement de la région du cortex qui traite les

informations visuelles, in vivo, chez la souris anesthésiée. Ces études ne peuvent pas être réalisées in vitro, ce qui nécessite l'utilisation des modèles murins adultes. Nous prévoyons d'utiliser au total 2780 souris. Cependant pour minimiser le nombre d'animaux utilisés, nous veillerons à effectuer les tests préliminaires sur des cultures cellulaires. De plus des expériences ex vivo sont réalisées pour mettre au point un certain nombre de paramètres et minimiser le nombre d'expériences in vivo. Plus généralement nous veillerons à respecter les règles de remplacement, de réduction et de raffinement. Le raffinement des méthodes expérimentales afin de réduire au maximum la souffrance animale est mis en œuvre et une surveillance rapprochée des points limites sera mis en place (comportement, apparence physique, score de grimace, perte de poids...). L'ensemble des procédures sera réalisé de manière à limiter la souffrance des animaux (anesthésie, analgésie post-opératoire). Les expériences seront menées par des personnels qualifiés, dans des locaux d'hébergement respectant les standards en vigueur (enrichissement, élevage en communauté...). A terme, les outils développés permettront de mieux comprendre le rôle exercé par l'activité d'un ou plusieurs neurones sur l'ensemble du réseau et les conséquences fonctionnelles de cette activation en conditions physiologiques ou pathologiques. Ces outils pourront être utilisés pour de nombreuses fonctions du cerveau. De plus une meilleure compréhension des réseaux neuronaux permettra de pouvoir concevoir et utiliser des modèles in silico pour mimer ces réseaux, et donc réduire l'utilisation des animaux.

9897 L'insuffisance rénale chronique (IRC) se définit comme la perte progressive et irréversible des néphrons, unités fonctionnelles du rein, responsable d'une diminution du débit de filtration glomérulaire. On estime que 600 millions de personnes sont atteintes d'IRC soit 5% de la population mondiale. En France, la pathologie touche environ 3 millions de patients. Les taux de mortalité et la morbidité sont élevés. Les traitements les plus utilisés restent la dialyse et la transplantation rénale. Les patients atteints d'IRC présentent un risque accru de développer des maladies cardiovasculaires. De nombreux facteurs dits « classiques » sont impliqués dans cette complication de l'IRC comme par exemple l'âge, l'hypertension artérielle, le tabagisme mais aussi le diabète, l'hypercholestérolémie ou encore l'obésité. De plus, d'autres facteurs de risque associés à l'IRC sont décrits, notamment, l'accumulation des toxines urémiques. En effet, L'IRC conduit à la rétention de toxines urémiques qui s'accumulent dans le sang et les tissus au lieu d'être excrétés par les reins. Deux d'entre elles, l'indoxyl sulfate (IS) et l'indole acétique acide (IAA) sont associées à la mortalité cardiovasculaire et globale. Ces toxines agissent grâce à un récepteur nommé AhR qui a un rôle sur l'activation plaquettaire et la synthèse de facteurs de l'inflammation et de la coagulation. Les modèles animaux d'insuffisance rénale chronique sont des outils importants pour l'étude des événements pathophysiologiques de la maladie rénale permettant ainsi des études translationnelles dont le but est d'améliorer la prise en charge des patients IRC.

Ce projet apportera de nouvelles données dans la compréhension du rôle d'AhR au cours de l'insuffisance rénale chronique. Il nécessite donc l'utilisation d'un modèle de souris invalidée pour le gène AhR chez lesquelles une insuffisance rénale chronique sera induite afin de valider nos hypothèses. Afin de respecter les règles d'éthique, la règle des 3R («Réduction/Raffinement/Remplacement») sera appliquée. Seules les expériences considérées comme absolument indispensables seront réalisées afin d'utiliser le moins d'animaux possibles (réduction) : rédaction d'un protocole expérimental avant toute expérimentation, utilisation des statistiques lors de la conception du protocole expérimental pour une estimation préalable du nombre d'animaux nécessaire et suffisant à l'obtention de résultats statistiquement exploitables. Les expérimentations seront optimisées dans l'optique de réduire, supprimer ou soulager l'inconfort, la douleur, la détresse ou l'angoisse subie par les animaux afin d'obtenir plus d'informations pertinentes à moindre coût en terme de "mal-être" animal (raffinement). Par exemple, les animaux seront élevés dans des cages avec enrichissement du milieu. L'enrichissement mis en place consistera en l'ajout de matériaux de nidification de type « Nestlets » dans les cages, ce qui réduira l'ennui. A chaque fois que cela sera possible, des modèles in vitro seront développés à la place des modèles in vivo (remplacement). Nous utiliserons le nombre minimum d'animaux pour chaque groupe, nécessaire à la réalisation d'un test statistique non paramétrique, soit un total de 108 souris. Le protocole sera arrêté si l'animal présente des difficultés à respirer (visualisées par une

augmentation des rythmes cardiaque et respiratoire répercutée au niveau des flancs de l'animal), si l'animal est prostré ou en retrait, si ses poils sont hérissés. Une grille d'évaluation de la douleur par score sera mise en place pour évaluer une souffrance animale éventuelle.

9898 Les plaquettes sanguines sont un des éléments essentiels de la voie de coagulation. Cependant de plus en plus de données de la littérature suggèrent une implication des plaquettes dans certains éléments clés de progression tumorale. Ce projet vise à définir le rôle des plaquettes sanguines dans la formation de métastases in vivo.

Pour cela différentes lignées cellulaires cancéreuses luminescentes seront injectées à des souris chez lesquelles on aura diminué ou augmenté, à l'aide de drogues ou de modèles génétiques, les taux de plaquettes. De plus des expériences seront également menées pour identifier un récepteur plaquettaire impliqué dans le processus de formation de métastases et qui pourrait alors servir de cible thérapeutique anti cancéreuse.

L'impact de ces différents traitements sur la formation de métastases sera analysé en utilisant un système d'imagerie dédié au petit animal.

Réduire : Le nombre d'animaux nécessaire a été déterminé au minimum mais néanmoins suffisamment pour pouvoir réaliser une analyse statistique pertinente. De plus il utilise un système d'imagerie du petit animal (IVIS Illumina LT) qui permet un suivi longitudinal d'un même animal donc une réduction du nombre total nécessaire. Le protocole expérimental prend en compte un potentiel impact sur la souffrance animale et différents critères ont été établis pour justifier un arrêt de l'expérience en cours. Une étude exhaustive des données récentes de la littérature n'a pas permis d'identifier une équipe réalisant des expériences similaires.

Raffiner : Des points limites ont été établis pour éviter toute souffrance animale. Les souris sont maintenues en groupe de 5 par cage pour maintenir une interaction entre individus. L'environnement d'élevage est enrichi à l'aide de carrés de cellulose pour la construction des nids et de tunnels et de balancelle en plastique rouge pour favoriser l'activité des souris. Les souris ont accès ad libitum à une nourriture de type normal (RM1) et à de l'eau filtrée. Si une souris présentait des symptômes traduisant l'apparition de douleurs (réduction de la réactivité, difficulté de locomotion, fourrure non entretenue, tendance à l'isolement) une injection en IP d'un analgésique sera effectuée une fois par jour (kétoprofène 1%, à raison de 15µl/10g de souris) jusqu'à disparition des symptômes.

Remplacement : Le modèle animal est nécessaire car il n'existe pas de modèle pour reproduire in vitro la cascade d'évènements qui sont analysés ici. 40 procédures comprenant 2 groupes, à raison de 8 souris par groupe, expériences en dupliqua soit en tout 1280 souris qui seront utilisées dans ce projet.

9899 L'imagerie par résonance magnétique (IRM) est l'une des techniques d'imagerie médicale récemment adaptées pour une utilisation en recherche animale. Cette technique permettra de visualiser avec une grande précision les organes et tissus mous, dans différents plans de l'espace. Au niveau du cerveau, cette technique permettra l'évaluation de la connectivité entre les différentes aires cérébrales. Certains facteurs techniques jouent un rôle important pour la qualité des images obtenues. Par exemple, les mouvements générés par la fréquence respiratoire élevée de l'animal lors de l'acquisition créent un bruit de fond important qui pourraient interférer avec l'interprétation et analyse de ces images. L'objectif de notre demande de projet est de définir un nouveau protocole de préparation des animaux afin d'améliorer la qualité des images obtenues (essentielle pour l'évaluation des altérations du réseau fonctionnel chez la souris). Ce nouveau protocole implique une étape d'intubation et de ventilation artificielle. Plus spécifiquement, notre approche comprend une optimisation expérimentale cruciale pour la réduction des artefacts de mouvement, actuellement observés lors de nos acquisitions. En accord avec le principe des 3Rs (réduction, raffinement, remplacement), nous avons réfléchi à notre projet de recherche de façon à réduire l'impact pour l'animal. Réduction et raffinement : en raison de sa qualité de protocole d'optimisation, l'étude applique directement ces deux principes. La mise au point d'un nouveau protocole expérimental conduira à l'amélioration de la qualité de nos futures données, permettant la diminution du nombre d'expériences non-fructueuses (qui pourraient contribuer à une surutilisation d'animaux).

De plus, les animaux sont hébergés de manière adaptée à leurs besoins et reçoivent une surveillance quotidienne et les soins adaptés (anesthésie, analgésie, stratégie pour éviter la déshydratation ou l'hypothermie; surveillance des signes cliniques). Remplacement : notre projet porte sur l'étude de la connectivité neuronale, en cohérence avec les études menées chez l'homme, et nécessite donc l'utilisation de systèmes complexes et entiers. Pour ces raisons, le remplacement avec des animaux de plus faible sensibilité, ou par des méthodes in vitro ou in silico n'est pas possible à ce jour. Notre projet nécessite l'utilisation d'un maximum de 12 souris.

9900 Le but du présent projet, proposé par 4 centres partenaires d'un réseau national de plateformes dédiées à l'expérimentation animale, est de standardiser plusieurs procédures classiques du phénotypage métabolique de la souris, afin que les résultats soient comparables d'un centre de recherche à un autre. Ces procédures comprennent la mesure de la dépense énergétique couplée à la surveillance de la consommation de nourriture et de boisson, l'analyse de la composition corporelle, la mesure des marqueurs métaboliques plasmatiques et un test fonctionnel de tolérance au glucose (GTT).

Les procédures seront réalisées sur deux souches de souris qui présentent des résultats différents dans ces procédures : la C57Bl6/J et la souris C3HeB / FeJ. Nous savons par ailleurs que de nombreux paramètres métaboliques fluctuent sur 24h (présence d'un rythme journalier) et que ces rythmes peuvent être modulés par la mélatonine circulante produite et sécrétée de manière rythmique sur 24h également par la glande pinéale. C'est la deuxième raison qui a conduit au choix de ces deux souches de souris pour notre étude car l'une la C57Bl6/J ne produit pas de mélatonine alors que l'autre présente un rythme de sécrétion de cette hormone. Nous pourrions alors examiner le rôle joué par cette hormone dans le contrôle journalier des paramètres métaboliques mesurés.

Pour les conditions de base, chaque plateforme exposera les animaux à son propre régime alimentaire standard. Les souris seront ensuite nourries avec un régime riche en graisses commun pendant 12 semaines. Les différentes procédures seront effectuées avant et après le régime. Ce projet nous permettra d'évaluer la reproductibilité entre centres et donc la robustesse de nos résultats pour le phénotypage des souris, ce qui est un prérequis pour démarrer des projets de recherches communs sur différents sites.

Nous utiliserons au total 64 souris pour ce projet. REMPLACER : les fonctions métaboliques qui de surcroît sont rythmiques sur 24h dépendent d'un réseau de structures centrales et périphériques. Il ne nous est donc pas possible pour notre étude de nous affranchir du modèle animal. REDUIRE : le nombre de souris par contre a été défini en tenant compte du nombre de procédures à réaliser sur chaque animal, du délai entre les procédures, de la variabilité interindividuelle des paramètres mesurés. RAFFINER : Les procédures seront réalisées dans le respect du bien-être animal pour limiter la souffrance, la douleur ou l'angoisse des animaux (les souris seront hébergées en cages collectives (n=4/cage) enrichies avec du matériel de nidation (carrés de ouate) et des bâtons à ronger. Les procédures invasives (prélèvements sanguins) seront réalisées sous anesthésie générale gazeuse et analgésie et le projet sera mené en respectant des points limites préalablement définis (une perte de poids atteignant 20%, un comportement anormal grave - arrêt d'alimentation - , un mutisme de plus de 24 h conduiront à un arrêt d'urgence de l'expérimentation).

9901 Toutes nos actions, perceptions, mémoires et émotions sont possibles parce que différentes régions de notre cerveau peuvent communiquer entre elles. Ces communications se font grâce à des rythmes électriques qui s'expriment dans le cerveau. La respiration induit un rythme qui, apparaissant de manière globale dans tout le cerveau, pourrait servir de « grande horloge » à tous les rythmes cérébraux. Notre projet pour les 5 années à venir s'inscrit résolument dans la problématique de l'étude des conditions d'apparition de la modulation des rythmes cérébraux par la respiration. Cette problématique est importante dans le domaine des neurosciences car les résultats auront non seulement des retombées scientifiques mais ils pourront aussi apporter des bénéfices médicaux. En effet, si nous parvenons à comprendre comment la respiration peut modifier l'activité du cerveau, nous pourrions expliquer l'effet de la respiration lente sur le bien-être et le stress dans la pratique de méthodes comme le yoga ou la méditation. Nous pourrions alors envisager des

méthodes alternatives non médicamenteuses - des séances de rééducation respiratoire - dans le traitement de certains troubles neurologiques.

Pour mener à bien ce projet, nous avons choisi de mener des études in vivo chez le Rat car :

- son cerveau est assez large pour pouvoir enregistrer simultanément l'activité de plusieurs aires cérébrales
- même si les mécanismes demeurent encore mal élucidés, les réseaux neuronaux impliqués dans la perception et la mise en mémoire des odeurs chez le Rat sont anatomiquement bien identifiés
- il est particulièrement adapté aux tâches comportementales basées sur des discriminations olfactives.

Engagement vis à vis des exigences des 3 R :

Remplacement : Les problèmes éthiques liés à l'enregistrement expérimental de l'activité de neurones individuels rendent ces expériences non envisageables chez le sujet humain. L'étude de la modulation des rythmes cérébraux par la respiration nécessite l'utilisation d'animaux vivants, qui respirent spontanément, et ne peut donc s'envisager sur modèles strictement in vitro.

Réduction : Pour mener ce projet, nous aurons besoin d'utiliser 285 Rats sur les 5 ans de projet. Ce nombre a été réduit au minimum en nous basant sur les données de la littérature.

Raffinement : Certaines questions seront abordées sur des modèles neuromimétiques que nous développons régulièrement dans l'équipe, ce qui nous permettra d'éviter l'utilisation d'animaux. Afin de pouvoir maintenir les animaux ensemble dans les cages après les chirurgies implantatoires, nous mettons au point un système de protection qui prévient la destruction des implants par les congénères. Dans les expériences sur l'animal en comportement, nous avons choisi d'enregistrer la respiration par une méthode non-invasive (pléthysmographe). Dans le but de diminuer le stress des animaux lorsqu'ils sont soumis à une atmosphère chargée en dioxyde de carbone, nous avons recours à une concentration très inférieure à celle utilisée classiquement dans la littérature.

Certaines procédures nécessitent une chirurgie. Tous les actes de chirurgie seront réalisés sous anesthésie et analgésie. Après la chirurgie, les rats recevront des antalgiques et seront étroitement surveillés. Toutes les mesures seront donc prises pour 1) limiter la souffrance et la douleur des animaux, 2) définir des points limites très clairs. L'expérience sera stoppée si ces points limites sont atteints. Le bien-être des animaux et en particulier des rats dans ce projet est un point critique non seulement pour les animaux eux-mêmes mais également pour la reproductibilité et la validité des expériences. Pour se faire, la santé des animaux sera continuellement évaluée selon une grille de scores définis.

9902 L'ostéoporose est une maladie caractérisée par une diminution de la quantité et de la qualité de l'os. Elle affaiblit le squelette et augmente le risque de fractures, particulièrement au niveau de la colonne vertébrale, du poignet, de la hanche, du bassin et de l'épaule. L'ostéoporose et les fractures qui en résultent sont une cause importante d'infirmité et de morbidité.

Nous pensons que la nacre pourrait permettre de réduire la perte de masse osseuse due à l'ostéoporose. La nacre est une substance naturelle très bien tolérée par l'organisme humain, contrairement aux thérapies actuelles anti-ostéoporotiques qui présentent des effets secondaires. Elle pourrait donc être une alternative à ces médicaments. La nacre est composée à 97% de carbonate de calcium (CaCO_3) sous forme d'aragonite et de 3% de composés organiques (chitine, polysaccharides, protéines, peptides, lipides).

En plus de l'apport calcique (38%) de la nacre, celle-ci contient des composés actifs, qui pourraient avoir un rôle dans la prévention de la perte osseuse.

Des résultats préliminaires ont montré chez des souris ovariectomisées que le fait de compléter la nourriture par de la poudre de nacre réduisait la perte osseuse. Cette étude a été réalisée par une équipe coréenne à partir de la nacre de l'huître perlière *Pteria martensii*. Cependant, dans cette étude, le procédé de réduction de la nacre en poudre n'était pas contrôlé.

Nous souhaitons réaliser une étude avec la nacre d'une autre huître perlière : l'huître perlière *Pinctada maxima*. Cette huître perlière présente l'avantage d'être une huître perlière élevée pour la production des perles (perliculture) donc sans problème de ressources et dans un contexte de développement durable.

En nous appuyant sur un certain nombre d'études déjà effectuées, avec un procédé de réduction de la nacre en poudre qui conserve les éléments actifs nous avons montré que cette poudre stimule la formation osseuse in vitro. Enfin des tests par voie orale chez le rat ont démontré l'innocuité de la poudre. Nous utiliserons une poudre de nacre avec une granulométrie comprise entre 50 et 150 micromètres (équivalent sucre glace), mélangée à un composant alimentaire à des concentrations sans danger pour l'animal.

Nous utiliserons comme modèle animal la rate ovariectomisée reproduisant les changements osseux rapportés dans l'ostéoporose chez la femme après la ménopause, conséquence de la carence en œstrogène. Le modèle d'ovariectomie chez le rat femelle est un modèle recommandé et un test pertinent et incontournable pour tester l'efficacité d'un produit sur la perte osseuse induite par la ménopause.

Immédiatement après la chirurgie, la supplémentation en poudre de nacre dans l'alimentation quotidienne commencera pour une période de 30 jours.

Le laboratoire a déjà réalisé des projets incluant le modèle de rates ovariectomisées, il a également publié sur les modifications du remodelage vasculaire accompagnant ou anticipant le remodelage osseux.

C'est pourquoi, nous proposons de faire l'étude en deux étapes, la première afin d'évaluer les paramètres osseux et la seconde, les paramètres de fluidiques vasculaires et interstitielles dans le fémur. Les traitements techniques des échantillons des deux études avant analyse n'étant pas compatibles.

Afin de mener à bien ce projet, 116 rattes femelles matures sur le plan squelettique âgées de 4 mois seront nécessaires (58/étude1 et 58/étude2). Chaque étude comprend un groupe "base line" (nourriture standard) de 10 animaux, et 4 groupes "avec chirurgie" de 12 animaux par groupe (G "Sham"- G nourriture standard - G complémenté CaCO₃ - G complémenté poudre nacre)

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

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

Pour nos expérimentations, nous avons prévu le nombre nécessaire d'animaux afin de garder une puissance statistique dans le traitement des résultats, et conclure avec les résultats de la première étude sur la réalisation ou non de la deuxième étude.

- « Raffiner » la méthodologie utilisée, ce qui implique la notion de points limites (critères d'interruption, ou "endpoints"). Nous allons porter une attention particulière au bien-être des animaux. Le suivi quotidien des animaux permet d'identifier des signes de souffrance caractérisés par l'état du pelage, le comportement (agressivité / apathie), cris, mobilité, alimentation... Le poids corporel sera mesuré tous les deux jours. Dans le cas où un animal présenterait des signes manifestes de souffrance ou perte de poids excessive ($\geq 20\%$ du poids initial), il sera sorti des procédures expérimentales.

- « Remplacer » les modèles animaux :

Nos questions scientifiques sont centrées sur les effets l'ajout d'un composé alimentaire, à des concentrations sans danger pour l'animal, sur la physiologie du système osseux et vasculaire intra osseux. Les expérimentations animales avec une physiologie intégrée sont donc primordiales. Des modifications engendrées au niveau de l'organisme entier, telles que les modifications des sécrétions hormonales (œstrogènes), influencent la cinétique de perte osseuse. De fait, nous nous sommes orientés vers un modèle animal pertinent d'ovariectomie chez le rat femelle par l'intérêt de la perte osseuse induite. Il n'existe pas de modèle cellulaire reproduisant nos procédures expérimentales.

Chaque animal bénéficie d'une attention et de soins de qualité, par du personnel qualifié, pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude. La douleur est rigoureusement contrôlée grâce à des points limites évalués en amont. Par ailleurs, les animaux sont hébergés dans un environnement enrichi (copeaux, 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.

9903 Ce projet vise à réaliser des travaux pratiques (TP) de pharmacologie expérimentale. Ce projet a pour objectif pédagogique de faire découvrir aux étudiants l'expérimentation *in vivo*, dans le respect de l'éthique en expérimentation animale. De plus, afin de respecter le bien-être animal, les étudiants sont peu nombreux en TP (6 par TP) et encadrés par du personnel qualifié (niveau concepteur pour chaque enseignant).

Nous travaillons dans le souci du respect de la règle des 3 R. Une attention particulière est portée afin de réduire le nombre d'animaux utilisés (réutilisation des animaux durant les 4 TP), de raffiner l'environnement (enrichissement dans les cages) et remplacer les animaux (en proposant également des TP *in vitro*). Les expériences menées sur les animaux dans le cadre de ces TP n'induisent, au maximum, que des douleurs légères (douleur inférieure ou similaire à celle induite par l'introduction d'une aiguille). Différents TP seront réalisés :

- Un premier TP sera basé sur la préhension des animaux (rats Wistar et souris Swiss) et sur les techniques d'administration par différentes voies.
- Un TP consistera à mesurer la pression artérielle en suivant le protocole non invasif du « tail cuff » chez le rat,
- Un TP consistera à réaliser des tests de tolérance au glucose sur rats et souris,
- Un TP consistera à réaliser des tests comportementaux chez la souris (chaque souris étant successivement testée sur 4 ateliers).

A l'issue du premier TP qui permettra aux étudiants de se familiariser avec le modèle animal, les trois autres TP s'enchaîneront sur plusieurs semaines avec les mêmes animaux, afin de réduire le nombre d'animaux utilisés.

Sur une période de 5 années, 60 rats et 120 souris seront utilisés pour ces enseignements.

9904 Plus d'un patient atteint de cancer sur deux bénéficie de radiothérapie et davantage pour le cancer des voies aérodigestives supérieures (VADS). Même à des stades avancés, la radiothérapie joue un rôle curatif majeur en causant par divers mécanismes la mort des cellules tumorales. Les progrès en immunologie du cancer permettent d'identifier des cellules immunitaires ayant un rôle anti ou pro-tumoral. L'irradiation est responsable d'une nette majoration de l'inflammation au sein des tumeurs conduisant à un recrutement majeur des cellules immunitaires dans la tumeur parmi lesquelles on compte les monocytes. Une fois dans la tumeur les monocytes vont se transformer en macrophages qui vont initialement participer à l'inflammation en la favorisant, puis après quelques jours, la diminuer et ainsi jouer un rôle pro-tumoral qui pourrait être responsables d'une partie des rechutes. En effet, leur présence dans la tumeur est un critère de mauvais pronostic dans de nombreux cancers et notamment dans les cancers des VADS.

L'étude que nous projetons est l'analyse d'une combinaison entre un médicament modulant les propriétés inflammatoires des macrophages et la radiothérapie. Il s'agit d'une approche translationnelle qui pourrait aboutir à des essais cliniques permettant d'améliorer les traitements des patients atteints de cancer des VADS. L'efficacité de la radiothérapie dépend des modalités de sa délivrance. La dose totale, la dose par séance et l'intervalle de temps entre les séances sont les principaux paramètres qui varient en routine clinique qui déterminent l'efficacité et la toxicité du traitement. La molécule que nous allons étudier a été testée *in vivo* en combinaison avec des immunothérapies et a montré un gain d'efficacité remarquable et soutenu. Nous avons donc fait l'hypothèse que cette molécule pourrait présenter une efficacité clinique en combinaison avec la radiothérapie. Aucune technique alternative au modèle animal ne peut remplacer aujourd'hui ce système complexe. Le modèle que nous allons utiliser correspond à l'administration de cellules tumorales immunologiquement acceptées dans la muqueuse jugale de souris que nous allons ensuite irradier localement à différentes doses en association avec un médicament administré par gavage oral.

Avant de tester cette molécule chez l'humain, nous devons pour répondre à trois questions. Quelle est la meilleure séquence thérapeutique entre la molécule et la radiothérapie selon une analyse de survie? Quel schéma de radiothérapie offre les meilleurs résultats en survie (selon la dose et le fractionnement)? Quelles sont les populations infiltrant les tumeurs pour ces différentes modalités, trois jours et cinq jours après la radiothérapie ?

Ces différents fractionnements permettent d'irradier différemment les vagues successives de population de cellules immunitaires infiltrant la tumeur et ainsi de répondre à la question de la sensibilité des cellules immunitaires au fractionnement et de faire des analogies pour adapter le traitement chez l'humain.

Pour répondre à ces questions, des greffes de tumeurs seront faites aux animaux, ainsi que des protocoles de radiothérapie et des traitements expérimentaux. Ces procédures expérimentales nécessiteront 792 souris. Elles ont pour objet principal la recherche translationnelle pour le traitement du cancer chez l'humain et pour objet secondaire la recherche fondamentale.

Les procédures expérimentales ont un caractère de stricte nécessité et ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants et susceptibles d'apporter le même niveau d'information tel que des insectes ou des non-vertébrés qui ne présentent pas d'homologie suffisante avec l'homme pour le système immunitaire et la radiobiologie. La souris est l'animal le plus utilisé dans ce domaine de la recherche avec des résultats qui ont permis à de nombreux traitements d'être testés chez l'homme avec moins de risque et plus de chance de réussite. Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est réduit à son minimum sans compromettre les objectifs du projet. Des calculs statistiques permettant de réduire au minimum possible le nombre d'animaux nécessaires pour obtenir un résultat sont réalisés en amont. 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 animaux proviendront d'un fournisseur agréé et seront hébergés dans des conditions optimales. Des mesures seront prises pour mettre fin dans les délais les plus brefs à toute anomalie ou à toute douleur, toute souffrance, toute angoisse ou tout dommage durable constatés qui pourraient être évités en définissant des points limites précis et adaptés. Toutes les procédures seront faites sous anesthésie, et des soins et compléments alimentaires seront donnés en cas de besoin. Les animaux bénéficieront d'un enrichissement environnemental en tout temps et seront hébergés en groupes sociaux.

9905 Le cancer du côlon ou cancer colorectal est le troisième cancer le plus fréquent en France et touche presque autant les femmes que les hommes. C'est également la deuxième cause de décès par cancer en France. Face à ce fléau, la meilleure arme repose sur une détection précoce ; néanmoins des progrès en matière de prise en charge sont nécessaires.

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 un modèle expérimental de tumeur colorectale induite par l'inoculation de cellules tumorales directement dans la paroi du côlon chez la souris. Après inoculation, les cellules tumorales vont former un ou des nodules cancéreux localisés.

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, ou l'imagerie par résonance magnétique (IRM).

En cours de suivi, des prélèvements de sang pourront être réalisés. En fin d'expérience, les tumeurs pourront être prélevées 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 400 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 colorectales. Avant toute administration à l'homme, l'animal constitue un passage obligatoire pour l'évaluation de l'efficacité, de la toxicité et de la pharmacocinétique d'un candidat médicament. À ce jour, la souris est l'espèce la plus adaptée à ce type de modèle d'étude.

Réduction : Un nombre minimal et 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 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-opératoire/post-anesthésie de l'état de santé des animaux ainsi que des soins adaptés afin de permettre une bonne récupération des animaux.

9906 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 histopathologique. 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.

Un des objectifs majeurs de la recherche dans le domaine SLA-DFT est donc de créer de nouveaux modèles murins qui pourraient être prédictifs et aideraient au développement de stratégies thérapeutiques. En 2010, une mutation du gène Chmp2B a été identifiée comme étant la cause d'une forme de SLA-DFT. Afin de nous rapprocher de la condition pathologique une nouvelle lignée de souris transgéniques portant cette mutation dans 1 ou deux allèles du gène CHMP2B a été générée. L'objectif de ce projet est de caractériser ces souris et de déterminer si elles développent un phénotype neurologique similaire à la SLA-DFT.

A terme, l'étude de ces souris devrait de plus permettre 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 730 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 dans ce projet, les animaux destinés aux analyses biochimiques ou histologiques seront au préalable inclus dans les études comportementales et fonctionnelles. Le nombre de souris incluses dans ce projet tient compte des tests statistiques utilisés lors de l'analyse des résultats ainsi que de la variabilité interindividuelle de ces modèles génétiques. Les tests statistiques utilisés seront le test t de Student (non apparié) pour la comparaison de deux groupes expérimentaux ou des tests de comparaison de variance (ANOVA) suivis d'un test de Tukey pour la comparaison de plus de deux groupes expérimentaux.

Raffinement : L'enrichissement de l'environnement des animaux (bâtonnets à ronger, coton compressé pour faire des nids, maisons en plastique rouge), le maintien des interactions sociales et la surveillance quotidienne des animaux permettront de s'assurer de leurs bien-être et de détecter rapidement tout changement de comportement associé ou non aux pathologies étudiées. Par ailleurs, lors des procédures expérimentales, toutes les mesures nécessaires sont mises en place pour réduire le stress, l'inconfort ou la douleur éventuelle liée à la procédure (acclimatation à la pièce, anesthésie, tapis chauffant pour maintenir la température corporelle, gel ophtalmique pour prévenir le dessèchement de la cornée etc...).

Remplacement : La SLA et la DFT sont deux maladies complexes d'origine multifactorielle et multicellulaire. Les cultures cellulaires ne permettent pas de modéliser l'aspect intégré et comportemental de ces pathologies et leur mise en place progressive. Nous avons donc besoin de

recourir à des modèles animaux qui présentent, en outre, une organisation du système nerveux proche de celle de l'homme pour réaliser ce projet de recherche.

9907 Ce projet concerne les traitements de la douleur neuropathique et inflammatoire. La première est due à une lésion ou une pathologie du système nerveux. Concernant les douleurs neuropathiques, certains antidépresseurs, anticonvulsivants et opioïdes représentent actuellement les meilleures thérapies disponibles, mais elles ne sont pas efficaces chez tous les patients et leurs effets secondaires sont nombreux. Le mécanisme conduisant à la douleur neuropathique, ainsi que les mécanismes d'action des traitements actuels ne sont que très partiellement connus, mais les données précliniques déjà existantes ouvrent des pistes pour de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles. Les douleurs inflammatoires sont quant à elles ciblées par des molécules appartenant à la classe des anti-inflammatoires stéroïdiens ou non-stéroïdiens (AINS) qui présentent également des effets indésirables.

Comment tester le potentiel thérapeutique de molécules sur la douleur neuropathique et inflammatoire ? Cet effort préclinique nécessite des modèles reproduisant la condition pathologique ainsi que sa réponse aux traitements existants et un paramètre simple permettant d'identifier facilement l'action thérapeutique et se prêtant à un criblage pharmacologique. REMPLACER : De tels modèles ne peuvent être obtenus que grâce à l'animal car la douleur est un processus intégré. REDUIRE : Ce projet vise à tester un grand nombre de molécules pour évaluer leur capacité à soulager la douleur. Il nécessitera un maximum de 2490 souris (sur une période de 5 ans) et sera conduit en réduisant chaque fois que possible le nombre d'animaux ainsi qu'en optimisant les procédures. Les animaux étant quasiment consanguins la variabilité phénotypique est considérablement diminuée, ce qui permet de réduire le nombre d'animaux tout en mettant en évidence un effet statistiquement significatif.

RAFINER : Les animaux (souris) sont hébergés de 2 à 5 par cage. Chaque cage est enrichie avec des papiers absorbant pour faire un nid, ainsi qu'avec un morceau de bois. Les souris font l'objet d'observations journalières. Tout animal montrant un signe de souffrance et dont l'état ne s'améliore pas sur une période de temps raisonnable sera mis à mort.

9908 L'obésité maternelle, chez l'homme comme dans des modèles animaux, est associée à un risque plus élevé d'apparition de troubles du développement cérébral (autisme, hyperactivité ...) chez la descendance. Les liens entre obésité pendant la grossesse et troubles neurodéveloppementaux ne sont pas encore établis. Notre hypothèse est que l'inflammation périphérique causée par l'obésité puisse modifier l'activation des cellules immunitaires du cerveau en développement du fœtus, et participer à la mise en place de ces troubles.

Dans ce projet, nous allons donc nous intéresser aux conséquences de l'obésité maternelle sur la descendance et plus particulièrement sur la survenue de troubles neurodéveloppementaux chez les petits et sur l'activité des cellules immunitaires cérébrales (les cellules microgliales). Nous pensons également que cette action sur les cellules microgliales de la descendance pourrait entraîner une modification de la réactivité de ces cellules en présence d'un stimulus inflammatoire et participer également à l'apparition de troubles neurodéveloppementaux.

Dans cette étude, des souris femelles recevront un régime riche en graisse et en sucre (Western Diet, WD), le plus à même de reproduire l'obésité telle qu'elle est observée dans les pays développés ces 30 dernières années. Après 5 semaines de WD, ces souris seront accouplées avec des mâles ayant reçu une alimentation classique et garderont ce régime pendant toute la gestation. Elles retrouveront un régime normal (Normal Diet, ND) pendant la lactation. Tous les petits recevront une ND après sevrage. Toutes les études porteront sur la descendance des femelles obèses, à différents temps. Parallèlement, des souris contrôles gestantes recevront une ND tout au long de l'étude. De plus, la moitié de chaque portée (WD et ND) recevra une injection intrapéritonéale de lipopolysaccharide (LPS), un composé classiquement utilisé pour mimer les infections bactériennes périphériques. Ces groupes permettront de voir si l'obésité de la mère, en augmentant la sensibilité des cellules immunitaires du jeune à une infection périnatale, entraîne l'apparition de troubles du développement cérébral.

Le présent projet concerne uniquement le test de comportement (apprentissage et flexibilité) qui sera réalisé sur la descendance adulte des femelles gestantes.

Réduction : dans les études portant sur le développement et les troubles associés au développement, l'unité statistique de référence est toujours la portée. De plus une différence entre les petits mâles et femelles est attendue. Les tests comportementaux seront donc réalisés sur un mâle et une femelle par portée. Quatre groupes seront constitués : ND-véhicule, ND-LPS, WD-véhicule et WD-LPS. Pour chaque groupe, 10 mâles et 10 femelles seront utilisés pour les tests comportementaux soit $(10+10)*4=80$ animaux. En effet, un effectif de $n=10$ par groupe est nécessaire pour réaliser des tests statistiques suites à la réalisation des études comportementales. Raffinement : les animaux seront hébergés en groupes socialement harmonieux dans des cages adaptées à leur nombre et à leur poids. Les animaux en groupe seront hébergés en présence de deux éléments d'enrichissement : une petite maison en carton (mouse smart home) et un bâton à ronger. Il est à noter que toutes les étapes du test de comportement seront filmées, ce qui évite que l'expérimentateur ne soit trop présent et stresse les animaux.

Remplacement : cette étude porte sur l'inflammation systémique et le développement cérébral, il n'est donc pas possible d'utiliser de méthode de remplacement.

9909 Les hépatopathies stéatosiques non-alcooliques sont en progression constante dans les pays occidentaux, et existent sous deux formes : la stéatose et la stéatohépatite. La stéatose simple est une accumulation pathologique de graisse dans le foie, alors que la stéatohépatite implique un phénomène inflammatoire. Elle peut être également compliquée d'une fibrose pouvant évoluer en cirrhose, ou du développement d'un carcinome hépatocellulaire, ce qui diminue grandement le pronostic vital de ces patients en comparaison à ceux dont le foie est purement stéatosique. Il est donc important de pouvoir distinguer ces deux populations de patients.

Cependant, aucune méthode non-invasive n'a encore été validée pour le diagnostic de la stéatohépatite, et les modèles animaux existants sont encore imparfaits. Nous proposons dans ce projet d'évaluer par imagerie par résonance magnétique plusieurs diètes provoquant chez la souris les caractéristiques cliniques de la stéatohépatite. Les données d'imagerie nous permettront également de déterminer quelle méthode est susceptible d'aider le diagnostic de la stéatohépatite. Pour cela, plusieurs méthodes seront testées, permettant d'évaluer la quantité de fibrose hépatique, la quantité de graisse, la présence d'inflammation ou encore la composition en acides gras des tissus. 160 souris seront utilisées au cours de ce projet de 3 ans, à raison de 40 animaux par groupe (3 groupes de diètes occasionnant de la stéatohépatite ainsi qu'un groupe de diète contrôle) qui seront évalués à différents temps durant l'administration de la diète.

En concordance avec la règle des 3 R, le nombre d'animaux par groupe a été choisi pour respecter les tests de puissance. Un seul groupe contrôle sera utilisé en comparaison avec les 3 diètes pathologiques choisies, et les deux objectifs du projet (l'identification du modèle de diète optimale et la validation des méthodes IRM) seront menés de front. Les diètes utilisées ainsi que les sessions d'imagerie réalisées sous anesthésie et avec monitoring constant n'occasionnent aucune douleur ou angoisse chez les animaux. De plus, une grille d'évaluation quotidienne sera utilisée pour évaluer la souffrance animale et agir en conséquence si les points limites définis sont atteints. Enfin, le modèle de stéatohépatite chez la souris obtenu par une diète spéciale permet d'étudier les interactions entre le foie et les autres contingents lipidiques, ce qui n'est possible de faire qu'en étude corps entier et donc avec un modèle animal.

9910 Chaque étude de ce projet a pour objectif principal d'étudier le devenir d'une molécule, candidat-médicament, chez le rat, lorsque cette espèce est utilisée au cours du développement préclinique de cette molécule (pharmacocinétique).

Pour cela, au cours de chaque étude, des prélèvements sanguins répétés ainsi que le prélèvement de liquide céphalo-rachidien (LCR) sont réalisés chez l'animal vigile ou transitoirement anesthésié après l'administration du candidat-médicament et éventuellement du véhicule qui a servi à préparer la formulation de la molécule testée ou un produit de référence.

Ces prélèvements de sang ou de LCR sont utilisés pour mesurer dans le temps la concentration du candidat-médicament administré et/ou de ses métabolites et éventuellement la concentration de différents marqueurs biologiques pertinents.

Le nombre prévisionnel maximum d'animaux est de 3500 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 étudier la pharmacocinétique d'un candidat-médicament. Or, avant toute administration à l'homme, l'animal constitue un passage obligatoire pour l'évaluation de l'efficacité, la toxicité et la pharmacocinétique d'un candidat-médicament. A ce jour, le rat est l'une des espèces qui est la plus adaptée à ce type de modèle d'étude.

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

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

- 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'éventuel signes cliniques
- la recherche des points limites
- le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire.

9911 Les cellules dendritiques (DCs) sont présentes dans tous les tissus. Leur principal rôle est de réguler positivement ou négativement l'activité des lymphocytes T. Cette décision doit être finement contrôlée pour permettre au système immunitaire de combattre efficacement les infections et le cancer par l'action des lymphocytes T, sans provoquer de dégâts dans les organes normaux (auto-immunité). Or, la peau est un organe particulièrement exposé à des infections, aux rayons UV, à des réactions inflammatoires et peut développer des cancers.

La peau comporte des poils ou cheveux qui sont continuellement renouvelés. Nous cherchons à comprendre, en l'étudiant chez la souris, l'influence des cellules associées au poil sur le cycle de vie des cellules de Langerhans (LCs), une population de DCs qui se trouve à proximité immédiate du poil.

Nous avons récemment observé que les LCs se divisent lorsque le poil entre en phase de croissance. Nos expériences préliminaires nous ont permis d'identifier une molécule impliquée dans le renouvellement des LCs, l'Interleukine-34 (IL-34). En effet, nous avons observé une augmentation de son expression dans les cellules du follicule pileux lorsque celui-ci est en croissance. Nous souhaitons confirmer cette hypothèse en utilisant des souris transgéniques permettant une ablation inductible et spécifique du gène codant pour l'IL-34 dans deux types de cellules souches du follicule pileux, qui donnent naissance à différentes sous-populations cellulaires le composant. Résoudre cette question est d'autant plus important que le follicule pileux représente une niche privilégiée pour les microorganismes bactériens, qui doivent rester sous la surveillance d'un nombre suffisant de LCs pour prévenir les infections cutanées.

Le nombre total de souris est de 300 animaux. Il n'est pas possible de remplacer les animaux car la peau comprend de multiples types de cellules, immunitaires ou autres, dont les fonctions sont régulées par les interactions permanentes qu'elles entretiennent entre elles. Ce système très complexe ne peut pas, à l'heure actuelle, être reproduit de manière fiable par des expériences de culture cellulaire.

Les connaissances rapportées dans la littérature et les tests in vitro montrant l'efficacité du ciblage d'un gène donné nous permettent de n'utiliser que 10 à 20 animaux par groupe, ce qui est le minimum nécessaire à une étude statistique fiable. Les expérimentations prévues sont de courte durée, et nous nous efforçons de prévenir toute souffrance éventuelle des animaux. Les prélèvements seront effectués sur souris mises à mort et les injections sous-cutanées seront pratiquées sous anesthésie générale par des personnels compétents. Nous pratiquerons également

le gavage des animaux : avec le matériel adéquat, cette technique permet d'introduire une molécule à des concentrations efficaces faibles et sans blesser les animaux, même juvéniles. Nous portons une attention particulière au raffinement des conditions d'hébergement : les animaux seront hébergés en groupe sociaux dans un environnement enrichi et observés quotidiennement.

9912 Outre ses déficits moteurs, la maladie de Parkinson s'accompagne de troubles sensoriels, émotionnels et cognitifs, de troubles de la dynamique respiratoire et des rythmes cérébraux. Notre hypothèse est que ces troubles de la dynamique respiratoire contribuent aux altérations des rythmes cérébraux, et consécutivement aux déficits sensoriels/émotionnels/cognitifs. Nous proposons de tester cette hypothèse dans une étude chez un modèle de rat de la maladie de Parkinson. Par une approche multidisciplinaire innovante, non applicable chez l'Homme, nous souhaitons découvrir quels sont les paramètres respiratoires déterminants pour un fonctionnement normal des rythmes cérébraux. Nous utiliserons alors ces paramètres pour restaurer la dynamique respiratoire et donc améliorer les performances chez les rats modèle de la maladie de Parkinson. Ce projet ouvre des perspectives nouvelles de remédiation basée sur la respiration qui pourrait être utilisée dans les pathologies avec dégradation des mouvements respiratoires.

Le modèle du rat est particulièrement approprié pour ce projet car :

- Le modèle de rat de la maladie de Parkinson a été développé et caractérisé et reproduit bien certains des symptômes de la maladie chez l'Homme
- Nous souhaitons enregistrer à la fois la respiration et plusieurs aires cérébrales, le cerveau du rat est assez large pour pouvoir faire des enregistrements simultanés
- Nous allons moduler de façon sélective l'activité de certaines zones du cerveau grâce à l'optogénétique pour trouver les liens causaux entre rythme respiratoire et fonctions cognitives.
- Les rats ont des capacités cognitives très bonnes et peuvent donc réaliser des tâches comportementales complexes similaires à celles utilisées chez l'Homme

Engagement vis à vis des exigences des 3 R :

Remplacement : L'enregistrement simultané de multiples aires cérébrales et l'utilisation de l'optogénétique rendent ces expériences non envisageables chez le sujet humain. L'étude des rythmes cérébraux et respiratoire couplée à des tâches comportementales nécessitent l'utilisation d'animaux vivants et ne peut s'envisager sur des modèles in vitro.

Réduction du nombre d'animaux : Pour mener ce projet, nous aurons besoin d'utiliser 410 rats pendant la durée de 5 ans du projet. Ce nombre a été réduit au minimum en nous basant sur les données bibliographiques antérieures et permettant de réaliser des analyses statistiques.

Raffinement : Nous avons choisi d'enregistrer la respiration de façon non-invasive en utilisant soit une cage de pléthysmographie soit des gilets connectés. Les lésions cérébrales pour créer le modèle de la maladie de Parkinson ont été choisies parce qu'elles ne perturbent pas le comportement moteur des rats mais reproduisent uniquement les altérations sensorielles, émotionnelles et cognitives de la maladie de Parkinson. Certaines procédures nécessitent une chirurgie. Tous les actes de chirurgie seront réalisés sous anesthésie et analgésie. Post-chirurgie, les rats recevront des antalgiques et seront étroitement surveillés. Toutes les mesures seront donc prises pour 1) limiter la souffrance et la douleur des animaux, 2) définir des points limites très clairs. L'expérience sera stoppée si ces points limites sont atteints. Le bien-être des animaux et en particulier des rats dans ce projet est un point critique non seulement pour les animaux eux-mêmes mais également pour la reproductibilité et la validité des expériences. Pour se faire, la santé des animaux sera continuellement évaluée selon une grille de scores définis.

9913 L'ataxie progressive est une anomalie neurodégénérative héréditaire qui existe chez les bovins. Les symptômes apparaissent relativement tardivement, vers 12-18 mois en moyenne, et se manifestent par une faiblesse et une incoordination des membres postérieurs qui s'accroissent avec le temps. La cause génétique de cette anomalie a récemment été identifiée. Elle conduit à l'inactivation du gène chez les bovins. Des mutations de ce même gène chez l'homme sont responsables de paraplégies héréditaires, d'anomalies du système nerveux, rares, mais invalidantes, qui provoquent une faiblesse progressive et des contractures des membres inférieurs. Cependant, le rôle du gène dans l'apparition de ces maladies est encore inconnu.

L'objectif de ce projet est de mieux comprendre la fonction du gène impliqué dans le syndrome bovin, ainsi que les mécanismes responsables de la pathologie nerveuse. La compréhension du rôle de ce gène présente donc un fort intérêt pour l'élevage mais aussi pour la santé humaine.

Chez l'homme ou chez le bovin, il est difficile de disposer de tissus nerveux (sains ou pathologiques) pour étudier le processus menant à cette pathologie. La modélisation de cette maladie chez la souris, est donc adaptée. Elle permettra de contribuer à l'étude du rôle de ce gène, non seulement dans le tissu nerveux, mais aussi dans d'autres organes où il est exprimé, notamment les muscles et la glande mammaire.

Plusieurs lignées transgéniques seront créées et différents paramètres seront analysés :

- Les défauts de fonctionnement du système nerveux (anomalies de coordination touchant notamment la locomotion, anomalies de comportement.)

- La production de lait chez les mères hétérozygotes et homozygotes (le gène étant exprimé dans la glande mammaire)

- La structure des muscles

Au total, ce projet utilisera environ 1248 souris sur 5 ans, nombre nécessaire et suffisant pour l'obtention de résultats statistiquement exploitables à l'aide de protocoles expérimentaux spécialement adaptés : croisements raisonnés permettant l'obtention conjointe de souris porteuses de l'anomalie (souris invalidées) et pour comparaison, de leurs contrôles, le groupe de souris de référence ne portant pas l'anomalie. Les animaux seront étroitement surveillés pour s'assurer de leur bien-être et les protocoles expérimentaux utilisés ont été choisis pour minimiser la souffrance. Le nombre d'intervention sur animal a été réduit au minimum et des protocoles d'anesthésie et d'analgésie déjà validés sur ces animaux de laboratoire sont utilisés. Ce projet n'implique pas de stress particulier (hormis le possible effet de l'invalidation du gène), ni de protocoles invasifs chez les animaux. Les souris bénéficieront dans chaque cage d'un enrichissement de leur milieu (sopalin, petites cabanes...). Les animaux seront en groupe pour éviter l'isolement. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience, afin d'intervenir rapidement et de manière appropriée si un problème était constaté.

9914 Chaque étude de ce projet a pour objectif principal d'étudier le devenir d'une molécule, candidat-médicament, chez la souris, lorsque cette espèce est utilisée au cours du développement préclinique de cette molécule (pharmacocinétique).

Pour cela, au cours de chaque étude, des prélèvements sanguins répétés ainsi que le prélèvement de liquide céphalo-rachidien (LCR) sont réalisés chez l'animal vigile ou transitoirement anesthésié après l'administration du candidat-médicament et éventuellement du véhicule qui a servi à préparer la formulation de la molécule testée ou un produit de référence.

Ces prélèvements de sang ou de LCR sont utilisés pour mesurer dans le temps la concentration du candidat-médicament administré et/ou de ses métabolites et éventuellement la concentration de différents marqueurs biologiques pertinents.

Le nombre prévisionnel maximum d'animaux est de 4200 souris sur 5 ans.

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

- Remplacement : Dans le cadre du développement de nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez la souris car il n'existe pas de méthode de substitution (in vitro ou in silico) pour étudier la pharmacocinétique d'un candidat-médicament. Or, avant toute administration à l'homme, l'animal constitue un passage obligatoire pour l'évaluation de l'efficacité, la toxicité et la pharmacocinétique d'un candidat-médicament. A ce jour, la souris est l'une des espèces qui est la plus adaptée à ce type de modèle d'étude.

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

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

- 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'éventuel signes cliniques
- la recherche des points limites
- le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire.

9915 Suite à une infection ou une vaccination, notre système immunitaire monte une réponse impliquant différentes cellules et molécules qui combattent l'infection et nous protègent contre une future exposition.

Les lymphocytes B jouent un rôle central dans cette réponse en reconnaissant de façon spécifique les agents infectieux et en produisant des anticorps de forte affinité qui vont se fixer à ces agents infectieux et ainsi favoriser leur neutralisation et leur élimination.

Nous travaillons sur une molécule qui contrôle la réponse immune au niveau des lymphocytes B en favorisant la production d'anticorps. Nous avons obtenu un modèle murin génétiquement modifié pour cette molécule qui nous permet de l'éliminer uniquement dans les lymphocytes B.

Afin de comprendre comment cette molécule agit sur la qualité de la réponse immune et comment cela pourrait impacter l'efficacité de la vaccination nous allons étudier la réponse vaccinale dans ce modèle animal.

Les souris utilisées dans ce projet proviendront d'un élevage entretenu et maintenu localement. Au total ce projet nécessite l'utilisation de 360 animaux tous génotypes confondus.

Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés dans ce projet, nous appliquerons la règle des 3R (Réduction, raffinement et remplacement). Tout d'abord, nous utiliserons des protocoles qui ont été discutés et élaborés afin d'utiliser un nombre optimal de souris, nécessaire et suffisant, pour des expérimentations statistiquement exploitables. De plus, seules les expériences indispensables à notre projet seront réalisées. Les réponses immunitaires dépendant de l'environnement complexe des organes lymphoïdes, il est impossible de remplacer totalement le modèle animal pour une étude poussée et complète comme nous souhaitons le faire.

A chaque fois que cela sera nécessaire, nous veillerons au bien-être animal en élaborant des méthodes permettant de réduire, supprimer, soulager l'anxiété et la détresse subit par les animaux, par exemple, en enrichissant les cages avec des rouleaux en cartons. Un suivi journalier sera effectué pour chaque souris de chaque procédure, et des fiches de bien-être animal seront établies faisant état des points limites à surveiller.

9916 Nous analysons les mouvements cellulaires dans l'embryon précoce de poisson. Pour ce faire, nous élevons des *Danio* afin d'effectuer de la reproduction naturelle et d'utiliser les œufs. Nos expériences portent uniquement sur l'embryon à un stade très précoce de développement (6 heures après fécondation). Aucune expérimentation n'est réalisée sur l'alevin ou l'adulte. Les adultes sont uniquement utilisés comme reproducteurs, pour l'obtention d'embryons. Lorsque les adultes atteignent l'âge de réforme (2 ans), ils sont sacrifiés. L'objet de cette demande est de valider la balnéation en eau froide comme méthode dérogatoire de mise à mort des adultes. Au vue de la littérature existante, cette technique semble en effet la méthode de mise à mort la plus humaine. Sur la durée du projet, 296 animaux seront ainsi sacrifiés.

Nos travaux portent sur l'analyse des migrations cellulaires, processus impliqués chez l'homme dans des processus physiologiques (cicatrisation, défense immunitaire) et pathologiques (progression tumorale). De nombreuses études abordent cette question sur des cellules en culture. Il est néanmoins aujourd'hui très clair que les mécanismes employés par les cellules diffèrent grandement entre une boîte de culture et un organisme vivant, impliquant la nécessité d'analyser ces phénomènes *in vivo*. La réalisation de tels travaux sur des modèles mammifères nécessite le recours à des techniques invasives, voire au sacrifice des animaux. Nos travaux seront effectués sur l'embryon de poisson qui peut être observé sans sacrifier de femelle gestante. De plus, l'embryon de poisson est largement transparent, autorisant l'observation de processus internes sans intervention invasive. Par ailleurs, le modèle poisson étant largement utilisé aujourd'hui, les connaissances et les outils nécessaires à la réalisation de nos travaux sont disponibles (génomique séquencé et annoté, nombreuses lignées mutantes ou transgéniques). Nos travaux, bien qu'effectués chez le poisson seront facilement transposables aux cellules humaines, qui utilisent les mêmes mécanismes pour migrer. Nos expériences portent exclusivement sur l'embryon à un

stade très précoce, les adultes sont uniquement sacrifiés lorsqu'ils atteignent l'âge de réforme. Un poisson adulte peut pondre une centaine d'œufs par semaine, pendant plus d'un an. Cette grande fertilité permet de réduire considérablement le nombre d'animaux utilisés pour produire les œufs. Les animaux sont maintenus dans des conditions assurant leur bien-être. Celui-ci est surveillé quotidiennement, par la recherche de signes comportementaux ou physiques indicateurs de stress, de douleur ou de pathologie. En cas de doute, nous nous adressons à notre vétérinaire référent, spécialiste des poissons. Le milieu de vie des animaux est enrichi par la distribution quotidienne de proies vivantes, permettant l'expression de l'instinct de chasse. Les animaux sont maintenus en groupe, conformément à leur nature grégaire.

9917 La sclérose amyotrophique latérale (SLA) ou maladie de Charcot est une maladie neurodégénérative progressive conduisant à une défaillance progressive du système neuromusculaire et à la mort des patients par insuffisance respiratoire. La perte de motricité est due à la mort des motoneurones qui commandent les muscles. C'est la plus fréquente des maladies du motoneurone chez l'adulte. Dans la majorité des cas, la maladie est sporadique mais dans 5 à 10% des cas, la SLA peut être "familiale". Différentes mutations dans différents gènes ont été identifiées dans des cas de SLA familiale, et de manière intéressante, certaines de ces mutations sont aussi associées à d'autres pathologies, en particulier avec des cas de démence fronto-temporale (DFT). Récemment, un nouveau gène a été identifié par notre équipe partenaire comme étant impliqué dans des cas de SLA familiaux et sporadiques. De manière intéressante, des mutations dans ce gène sont également retrouvées dans des cas de DFT-SLA (cas de SLA avec troubles cognitifs de type Démence Fronto-Temporale). A ce jour, aucun traitement n'est disponible contre la SLA ou la DFT-SLA. D'un point de vue étiologique, les mécanismes responsables de la mort des motoneurones sont encore méconnus. De même, les mécanismes par lesquels une même mutation peut causer des symptômes de type SLA ou DFT-SLA ne sont pas connus.

Un modèle de souris porteur de ce gène a été produit. Un projet de recherche visant à comprendre les mécanismes biologiques, biochimiques et neurologiques aboutissant à la mort des motoneurones est en cours dans un laboratoire partenaire. Les résultats préliminaires obtenus à ce jour indiquent que les souris développent un phénotype dommageable de type SLA avec une perte de poids débutant vers l'âge de 3 mois et de légers problèmes de train arrière sans atteinte majeure de la locomotion vers 4 mois. Si la caractérisation des mécanismes liés à la mort des motoneurones dans ce modèle est en cours d'étude, rien n'est encore connu quant au suivi de l'apparition des troubles moteurs et des éventuelles dysfonctions cognitives. Un autre élément fondamental lié à toutes les maladies neurodégénératives est la neuroinflammation, caractérisée par une quantité élevée de molécules pro-inflammatoires dans le système nerveux, une altération de la barrière hémato-encéphalique qui protège normalement le cerveau, une activation des cellules gliales et une infiltration de certaines cellules sanguines. La neuroinflammation peut être cause ou conséquence de la mort des neurones. Là encore, rien n'est actuellement connu au sujet de la contribution de la neuroinflammation dans les cas de DFT-SLA liées à la mutation du gène identifié. Dans ce projet, nous proposons d'étudier, à un stade précoce de la maladie, ces différents aspects, en comparant des souris mâles et femelles hétérozygotes pour la mutation du gène d'intérêt avec des souris contrôles issues des mêmes portées. Les troubles moteurs fins seront recherchés dans une première série de tests comportementaux réalisés à l'âge de 4 mois (âge auquel les souris ne présentent pas de troubles moteurs majeurs d'après les résultats préliminaires de l'équipe collaboratrice). Si aucune différence n'est observée, la caractérisation comportementale de la fonction motrice sera reproduite un mois après, à l'âge de 5 mois.

A l'issue de cette caractérisation, et par souci de réduction, les mêmes souris seront, après une période de récupération, évaluées dans des tests cognitifs relatifs à l'anhédonie (insensibilité au plaisir), l'anxiété, la résignation, la sociabilité et aux troubles mnésiques. De manière importante, ces tests seront volontairement réalisés à un âge où les souris ne présenteront pas encore de troubles moteurs majeurs qui perturberaient l'interprétation correcte des tests cognitifs. A l'issue de cette caractérisation cognitive, les mêmes souris seront sacrifiées et leurs fluides et organes seront prélevés en vue de la réalisation de l'étude des paramètres neuroinflammatoires.

Par souci de raffinement, les souris seront soumises à un suivi optimal grâce à l'utilisation d'une grille d'observation détaillée en lien avec le phénotype attendu de DFT-SLA.

Enfin, il faut noter que dans un but de remplacement, certaines expériences sont réalisées sur des cellules en culture (muscles, fibroblastes de patients humains) mais que la complexité du développement de la maladie, qui touche différents organes, n'est malheureusement pas transposable dans des cellules en culture et nécessite d'être étudiée dans l'animal vivant, au cours du temps, dans différents tissus.

Au final, le présent projet de recherche utilisera un total de 145 souris, dont seule la moitié présentera un phénotype dommageable de type DFT-SLA. Toutes les mesures d'observation seront mises en œuvre pour assurer le bien-être optimal de ces souris jusqu'à leur sacrifice.

9918 Ce projet a pour objectif de former des étudiants se destinant à la recherche en Sciences du Vivant à la manipulation du rat lorsque son comportement est l'objet d'étude. Cet enseignement pratique sera intégré dans des formations destinées à initier les étudiants à la recherche en psychologie expérimentale animale et neurosciences comportementales. La période de 5 ans pour laquelle il est demandé correspond à celle de l'accréditation de ces formations (2019-2023). A l'issue de ces deux formations, les animaux seront utilisés pour les travaux pratiques de la formation à l'expérimentation animale (niveau conception de procédures et de projets) organisées pour des doctorants devant suivre cette formation réglementaire.

Règle des 3R. Dans la mesure où ce projet a pour objectif de former les étudiants à travailler avec des animaux vigiles, la première règle, soit celle de Remplacer, ne pourra être appliquée ; les deux autres le seront de manière à réduire au maximum le stress ou l'angoisse des animaux, ainsi que le nombre d'animaux nécessaires au projet. En ce qui concerne la règle de Raffiner, les animaux seront hébergés par binôme dans une cage enrichie avec du bois à ronger durant tout le projet. Les tests comportementaux qui seront utilisés sont adaptés aux capacités naturelles des rats (locomotion, nage), ne nécessiteront aucune restriction de leur bien-être (pas d'isolement social ni de restriction de leur accès à la nourriture ou à la boisson) et aucune stimulation nociceptive ne leur sera appliquée. Les animaux seront manipulés régulièrement par des personnes compétentes avant le début du projet afin qu'ils soient suffisamment habitués avant leur premier contact avec les étudiants. Une attention toute particulière sera portée à l'apprentissage initial de la capture et de la préhension de l'animal, et la présence continue d'un encadrant garantira la qualité de l'apprentissage du savoir-faire nécessaire à la réalisation de tests comportementaux. En ce qui concerne la règle de Réduire, un même groupe d'animaux sera utilisé pour toutes les formations d'une année universitaire (60 par an soit 300 pour la totalité du projet demandé pour les 5 années de l'accréditation des formations) ; ce nombre annuel a été calculé au plus juste des besoins compte-tenu des objectifs de chacune des formations et du nombre d'étudiants anticipé. Les enseignements pratiques sur le Rat ont ainsi été placés dans le calendrier de manière à ce que les mêmes animaux puissent être utilisés et ont été suffisamment regroupés pour qu'ils puissent être mis à mort avant un âge auquel ils pourraient commencer à souffrir de pathologies liées au vieillissement. A l'issue de leur mise à mort, leur cerveau sera prélevé et congelé afin de disposer du matériel nécessaire à d'autres formations ou à des mises au point techniques pour des projets de recherche (approches histologiques ou de biologie moléculaire), contribuant ainsi à limiter le nombre d'animaux utilisés à ces seules fins.

9919 De nombreuses pathologies dites « prolifératives » comme le cancer ou certaines rétinopathies sont caractérisées par un développement de vaisseaux sanguins incontrôlé, autrement appelé angiogenèse pathologique. Dans l'œil, les deux pathologies majeures présentant une composante vasculaire sont la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) et la rétinopathie du diabétique. La prise en charge clinique de l'angiogenèse rétinienne est basée sur l'utilisation d'anticorps anti-VEGF (anti-vascular endothelial growth factor). Cette approche est confrontée à des problèmes d'efficacité à long-terme, de tolérance et de toxicité. De nouvelles voies de signalisation de l'angiogenèse ainsi que de nouveaux agents pharmacologiques les régulant sont donc explorés aujourd'hui. A ce titre, le récepteur ALK1 (pour Activin receptor-Like Kinase 1) représente une piste prometteuse. ALK1 est un récepteur de la famille des récepteurs du TGF-beta principalement

exprimé à la surface des cellules endothéliales, suggérant un rôle particulier dans l'angiogenèse. L'objectif du projet est d'évaluer l'effet préventif de l'administration d'un nouvel inhibiteur d'ALK1 sur le développement néo-vasculaire pathologique rétinien. A travers une étude sur 50 rats, il évaluera l'intérêt de l'administration de l'inhibiteur d'ALK1 par voie topique (10 animaux), sous-conjonctivale (10 animaux) et intra-vitréenne (10 animaux) sur une angiogenèse induite. Deux autres groupes de 10 animaux chacun serviront de groupes contrôles. L'angiogenèse rétinienne sera évaluée à travers des examens du fond d'œil. Ces travaux permettront de valider l'efficacité in vivo d'une nouvelle molécule destinée à la prévention des stades avancés de la DMLA et de la rétinopathie diabétique. Il apportera des éléments quant à la voie d'administration la plus adaptée à un usage oculaire. La mise en œuvre du projet s'inscrira dans la règle des 3R.

Réduire : Pour chaque voie d'administration, le nombre d'animaux sera réduit à 10, qui est nombre minimum nécessaire afin de pouvoir analyser correctement les paramètres physiologiques liés au développement néo-vasculaire, ceci compte-tenu : 1) de la variabilité généralement observée dans de telles mesures et les risques d'opacification cornéenne et de cataracte qui peuvent être engendrées par les protocoles expérimentaux ; 2) des directives d'utilisation des animaux dans la recherche en vision et ophtalmologie (directives de l'Association for Research in Vision and Ophthalmology ou ARVO) interdisant de travailler sur les deux yeux d'un même animal.

Raffiner : Chaque procédure sera réalisée en réduisant ou supprimant la douleur, en limitant la souffrance et le stress des animaux. A cette fin, des anesthésiques seront utilisés lors de l'induction des néo-vaisseaux, l'administration des traitements et l'imagerie rétinienne. L'unité dans laquelle le projet sera réalisé dispose d'une Structure chargée du Bien-Etre Animal qui veillera et aidera les expérimentateurs à améliorer les conditions de réveil après anesthésie.

Remplacer : La rétine est un tissu neurosensoriel composé de l'association de plusieurs types cellulaires. Le fonctionnement coordonné de tous ces types cellulaires assure la fonction globale de la rétine, et à l'inverse un dysfonctionnement d'un type cellulaire ou de l'environnement de ceux-ci peut être à l'origine du développement d'une pathologie. Seule une étude macromorphologique de la rétine sur un modèle animal peut rendre compte des paramètres évalués.

9920 Ce protocole d'expérimentation animale s'inscrit dans un projet de recherche en régénération osseuse à partir de cellules souches mésenchymateuses de moelle osseuse associées à des biomatériaux. Ce projet permettra la fabrication de substituts osseux par impression 3D à partir d'images scanner de patients et leur association avec des cellules souches mésenchymateuses.

L'implantation d'un mélange extemporané de cellules souches mésenchymateuses humaines et de biomatériaux en site ectopique sous cutané et intramusculaire chez la souris Nude nous a permis de mettre en évidence la formation d'un tissu osseux. Après avoir déterminé les meilleures conditions de culture des cellules souches mésenchymateuses humaines associées à des biomatériaux imprimés en 3D, il nous est nécessaire de confirmer la régénération de défauts osseux de taille critique. Chez la souris, le seul site permettant la création chirurgicale d'un défaut osseux de taille critique est situé au niveau de la voûte crânienne, appelée Calvaria.

Le but de cette étude est donc d'évaluer le potentiel de régénération osseuse de cellules souches mésenchymateuses humaines associées à des biomatériaux imprimés en 3D, déficients en calcium ou triphasés en phosphate de calcium au niveau de défauts de Calvaria de souris. Les expérimentations en lien avec ce projet n'ont pas encore commencé et nécessiteront un nombre total d'animaux de 324.

Au cours de cette étude, nous nous engageons à respecter au maximum la règle des 3Rs :

-Remplacement : pour cette étude sur la régénération osseuse, il n'existe pas de méthode alternative à l'utilisation d'animaux. En effet, nous pouvons produire une matrice minéralisée in vitro à partir de cellules souches mésenchymateuses, mais la formation osseuse ne peut se faire que dans un modèle d'expérimentation animale. De plus, nous n'avons pas de méthodes in vitro nous permettant de prédire le potentiel régénératif des cellules souches en site osseux. Notre modèle de défaut osseux au niveau de la Calvaria de souris Nude est donc indispensable pour étudier les propriétés ostéogéniques des cellules souches associées à différents biomatériaux.

-Réduction : nous avons optimisé les expérimentations afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, tout en ayant des résultats statistiquement fiables : nous n'utiliserons qu'un seul groupe contrôle

pour les défauts osseux vides, et 8 donneurs de moelle osseuse seront testés avec 2 biomatériaux. Nos pratiques d'hébergement et le soin apporté aux animaux tout au long du protocole expérimental favorisant un taux de survie très élevé après la chirurgie, nous n'aurons pas besoin de réitérer plusieurs fois les expériences prévues.

-Raffinement : l'hébergement des animaux sera effectué en cage par 5 avec nourriture et eau à volonté, en portoir ventilé et température stabilisée à 20°C, avec un cycle artificiel jour/nuit de 12 h. La température corporelle des souris est maintenue à 36,5 ° C ± 0,5 ° C à l'aide d'une plaque chauffante pendant l'intervention chirurgicale et jusqu'au réveil où l'animal est hautement surveillé. Nous veillerons à ce que les animaux soient maintenus en groupes sociaux stables et nous limiterons au maximum le stress de manipulation et de contention. Nous nous engageons à respecter les points limites (présence d'infection sévère au niveau du site chirurgical, perte de poids importante, mutilations) et surveillerons attentivement les problèmes comportementaux (isolement, posture, entretien). Comme l'exige la réglementation, les animaux seront observés quotidiennement.

9921 Le trouble du spectre autistique (TSA) est une maladie, d'origine neuro-développementale, qui touche environ 1 enfant sur 70. Les facteurs génétiques, ainsi que les facteurs environnementaux jouent un rôle important dans l'étiologie de cette complexe maladie. Caractérisée par les troubles de communication et d'interaction sociale ainsi que les comportements répétitifs stéréotypés, les individus touchés par cette maladie manifestent souvent une réponse inappropriée aux stimulations sensorielles (hypersensibilité ou hyposensibilité sensorielle). Ce dernier est provoqué par un défaut de traitement de l'information sensorielle dans le système nerveux et représente un défi important pour la vie quotidienne des enfants touchés par cette maladie. À ce jour, il n'existe aucun traitement pharmacologique ciblé pour améliorer la vie des individus atteints de TSA. L'objectif de ce projet est de conduire à une meilleure compréhension des processus neurobiologiques sous-jacents les défauts de traitement de l'information sensorielle chez un modèle murin de TSA. Pour mener notre étude, nous utilisons une approche d'électrophysiologie in vivo, pratiquée sur les souris anesthésiées, en combinaison avec une stimulation sensorielle non-douloureuse et l'administration de certaines molécules potentiellement thérapeutiques. Les bénéfices attendus de notre projet de recherche sont une meilleure compréhension des altérations neuronales sous-jacents le TSA, et, à terme, l'identification de nouvelles stratégies thérapeutiques pour améliorer les symptômes de TSA. Pour réaliser ce projet de fort impact préclinique, le modèle animal est indispensable. En accord avec le principe des 3Rs (réduction, raffinement, remplacement), nous avons réfléchi à notre projet de recherche de façon à réduire au minimum le nombre d'animaux utilisés ainsi que la souffrance imposée par les procédures détaillées dans ce document. Réduction : afin de ne pas utiliser plus que le nombre minimal d'animaux nécessaires pour que nos résultats soient statistiquement exploitables, nous avons développé une stratégie d'expérimentation permettant de limiter au maximum le nombre d'animaux utilisé pour chaque expérience. Cette stratégie comprend une analyse statistique de nos données obtenues antérieurement afin d'identifier une taille d'échantillon adaptées à ce type d'expérience. Raffinement : les animaux seront hébergés dans une manière adaptée à leurs besoins et recevront une surveillance quotidienne et les soins adaptés. Plusieurs raffinements spécifiques aux procédures seront également appliqués (utilisations des produits anesthésiques et analgésiques, définition des points limites précoces et mesures conservatoires, et soins adaptés). Remplacement : Le projet porte sur l'étude du traitement de l'information sensorielle dans le néocortex. Il nécessite, donc, la présence de circuits intacts, permettant la transmission des signaux électriques entre le système nerveux périphérique et le système nerveux central et entre les différentes zones cérébrales. Un modèle animal génétiquement modifié est absolument nécessaire pour reproduire la complexité de ces interactions neuronales et ne peut pas être remplacé par les études in vitro ou in silico. Les études cliniques ne sont pas adaptées à notre question scientifique. L'utilisation des modèles de plus faible sensibilité neuronale (tels que la mouche à vinaigre) n'est pas adaptée à notre projet, parce que cet organisme manque la structure cérébrale concernée. Cependant certaines études seront a priori effectuées in vitro afin d'évaluer la conséquence de l'application des molécules novatrice, avant leur

administration in vivo. Nous avons estimé le nombre maximum d'animaux nécessaire à ce projet crucial à 210 animaux.

9922 Les maladies cardiovasculaires représentent une des principales causes de décès dans les pays industrialisés et la première cause chez les femmes entre 25 et 55 ans. Parmi ces maladies, l'insuffisance cardiaque est une conséquence très fréquente d'un rétrécissement de l'aorte. Ce rétrécissement, qui se forme soit par un dépôt de graisse dans l'artère (athérosclérose) ou un rétrécissement de la valve aortique par calcification, est responsable d'un obstacle à l'écoulement. Ceci va donc faire contracter le cœur contre un obstacle ce qui va avoir tendance à l'épuiser et donc à faire qu'il se contracte de manière insuffisante. Cette insuffisance cardiaque s'aggrave très souvent vers un infarctus et donc nécessite une intervention chirurgicale au préalable. Sans cette intervention les patients décèdent mais cette opération délicate n'est pas sans conséquence et peut s'avérer parfois être la cause de complications post opératoire d'où l'importance de la recherche médicale pour trouver des solutions de protection du cœur. Notre équipe a récemment montré que le moment de la journée (matin – après midi) et donc le rythme de l'horloge biologique naturelle influence la survenue ou non de complications post-opératoire et que la mise en œuvre d'un traitement visant à mettre le patient en « décalage horaire » pendant la durée de la chirurgie pourrait être une nouvelle stratégie de cardioprotection efficace. Cependant, afin de pouvoir proposer une solution thérapeutique efficace et sans risque pour les patients, il est nécessaire de bien comprendre comment fonctionne ce « décalage horaire » et voir si, sur des cœurs pathologiques, il peut être efficace. Dès lors nous avons besoin de mettre en œuvre un modèle expérimental sur des souris mâle et femelle qui reproduit la pathologie humaine. Ce modèle permettra d'évaluer la potentielle protection du cœur en fonction du moment de la journée en réalisant des décalages horaires sur les souris en modulant le cycle lumière obscurité. Si nous parvenons à montrer, au moyen de cette étude d'une durée de 3 ans, qu'effectivement sur des cœurs de souris ce décalage horaire protège le cœur de l'infarctus nous pourrions envisager le traitement par un candidat médicament que nous sommes en train de développer et qui permet de décaler l'horloge circadienne de manière courte, le temps de la chirurgie cardiaque, et ainsi diminuer très fortement le taux de complications post-opératoire et la mortalité associé à ces pathologies chez les patients. Pour cela, nous devons réaliser un acte chirurgical sur les souris pour réduire le diamètre de l'artère aorte comme cela se produit chez le patient. Les souris seront préalablement hébergées dans des armoires spécifiques permettant de régler le cycle lumière obscurité à façon et donc de pouvoir mettre les souris en décalage horaire simplement en modifiant le réglage des armoires. Les souris sont 4 par cages avec enrichissement, coton, maison, tunnel afin de limiter au maximum les conditions de stress et n'avoir que le décalage horaire à subir (RAFFINEMENT). Notre équipe a d'ores et déjà démontré l'impact de ce décalage horaire sur la taille d'infarctus. Ces expérimentations visent à vérifier si dans les conditions pathologiques identiques à l'homme, ce moyen peut également s'avérer efficace. Si tel est le cas un traitement médicamenteux pourra être envisagé chez l'homme.

Les conditions pathologiques humaines étant complexes, fruit du rétrécissement de l'aorte ou de la calcification de la valve, mais également dues au phénomène inflammatoire et à la souffrance cellulaire en elle-même, il n'est guère possible d'utiliser un modèle qui ne serait pas in vivo. Néanmoins, post-chirurgie, nous utilisons une méthode de substitution pour évaluer la fonction cardiaque (REMPACEMENT). En effet l'utilisation de cœur isolé perfusé nous permet de ne pas infliger de contraintes et de stress répété aux souris (RAFFINEMENT-REMPACEMENT) et surtout de diminuer considérablement le nombre de souris utilisées puisque les tests statistiques ainsi que l'expérience de l'équipe montrent que seulement 10 souris par groupe sont nécessaires pour avoir des résultats fiables et scientifiquement exploitables (REDUCTION). Cependant, afin d'étudier l'impact de l'horloge biologique et donc du décalage de cette horloge nous avons besoin de plusieurs groupes ainsi que de souris mâle et femelle ce qui pour cette étude de 3 ans fait un total de 240 souris soit 8 souris par mois. Les souris sont stabulées dans des cages hyper enrichies et des armoires chauffées isolées phoniquement afin de ne pas être perturbées par les bruits extérieurs (RAFFINEMENT). Les souris sont anesthésiées sous isoflurane et leur température corporelle est maintenue. Immédiatement après la chirurgie et encore sous anesthésie, une

injection d'analgésique est réalisée afin que la souris se réveille sans douleur (RAFFINEMENT). La souris opérée est placée seule dans une cage dans une armoire pendant 12 h afin de récupérer pleinement de l'anesthésie et de ne pas se faire grignoter la suture par ses congénères (REDUCTION). La souris est surveillée toute les heures pendant les 6 premières heures de réveil puis dès le lendemain matin. Si les critères d'arrêt ne sont pas observés (infection de la suture ou réouverture de la suture) la souris est remise dans sa cage d'origine avec ses congénères afin de reprendre une activité sociale (RAFFINEMENT). A l'issue de la période d'établissement de l'insuffisance cardiaque induite par le rétrécissement de l'aorte la méthode de substitution d'exploration de la fonction cardiaque est mise en œuvre et l'ensemble des autres organes (foie, intestin, cerveau, muscle, graisse et peau) est collecté pour la banque de tissu du laboratoire (REDUCTION).

9923 L'État de Stress Post-Traumatique (PTSD, pour Post-Traumatic Stress Disorder, APA 1994) est une pathologie psychiatrique à forte prévalence dans la population générale (8 – 12%) qui, en l'absence de prise en charge adaptée, peut se compliquer en formes handicapantes et comorbides (dépression, addictions, anxiété, etc.)

Le PTSD se développe à la suite du vécu d'un événement traumatisant et va induire un certain nombre de symptômes. On retrouve ainsi chez les patients un syndrome de reviviscence traumatique, un évitement des stimuli associés au traumatisme, une activation neurovégétative et enfin des troubles de l'humeur et de la cognition. De plus il a été noté des modifications cérébrales, telle qu'une hypoactivation du cortex préfrontal (CPF), une hyperactivation amygdalienne et enfin des altérations dans l'activité hippocampique. L'implication de l'hippocampe dans la vulnérabilité à cette pathologie a été bien documentée. Or, au sein de l'hippocampe, de nouveaux neurones sont formés à l'âge adulte. On peut donc penser que ces néo-neurones pourraient être impliqués dans la vulnérabilité à développer un PTSD.

Pour une étude approfondie de cette pathologie et notamment de l'implication des néo-neurones dans le développement de celle-ci, l'utilisation d'un modèle animal est nécessaire. Nous utiliserons donc un modèle murin de PTSD induisant des modifications comportementales durables, associées à la symptomatologie et aux altérations neurobiologiques chez l'humain. De plus une augmentation de la neurogenèse sera induite chez ces animaux.

Le but de cette expérience est d'évaluer les effets d'une augmentation de la neurogenèse adulte sur l'activité des circuits neuronaux touchés dans le PTSD. Nous avons précédemment mis en évidence un effet des neurones âgés de 4 semaines sur la sévérité des symptômes comportementaux. Cependant les mécanismes et circuits qui sous-tendent ces effets restent à déterminer.

Pour cela grâce à l'utilisation de traceur rétrograde nous allons observer l'effet d'une augmentation du nombre de nouveaux neurones sur l'activité neuronale et plus particulièrement sur l'activité des projections de l'hippocampe vers le CPF et l'amygdale. Nous testerons 8 lots expérimentaux, qui se distingueront par 3 facteurs : le fait d'avoir ou non subi le stress traumatique, le fait d'avoir ou non la mutation génétique nécessaire, et enfin le fait d'avoir ou non subi l'administration de Tamoxifène (qui active la construction génétique). Ainsi, il y aura $8 * 20 = 160$ souris. En application de la règle des 3 R au modèle utilisé dans l'étude :

Raffinement : le stress traumatique appliqué aux animaux peut être qualifié de moyen, en raison de sa brièveté. Les conditions d'élevage des animaux non stressés seront optimales au regard des normes en vigueur avec enrichissement des cages d'hébergement est systématique (cabanons, tubes et smarthomes®).

Remplacement Ce modèle s'intéressant au comportement animal, il ne peut s'entreprendre que sur l'animal vivant et aucune méthode de remplacement (par exemple, une étude in vitro) n'est envisageable. Le stress chez l'animal, comme modèle de pathologie psychiatrique humaine, repose sur l'observation du comportement de l'animal vivant. Aucun marqueur cellulaire in vitro n'est disponible. De plus, les dosages biologiques requièrent des prélèvements frais qui ne peuvent être réalisés que sur animaux sacrifiés avec délai post-mortem et conditions de prélèvement contrôlés.

Réduction : les effectifs sont optimisés, les observations comportementales nécessitent une taille d'effectifs suffisant compte tenu de la variabilité interindividuelle ($n=20$ sujets par groupe). De plus,

la rationalisation des procédures permet d'optimiser l'utilisation des échantillons cérébraux prélevés.

9924 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 que des défaillances de ces neurones étaient liées à des défauts cognitifs, comme par exemple chez des patients autistes, schizophrènes ou au cours du vieillissement cérébral. 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.

Notre laboratoire travaille sur les gènes *Dlx* qui régulent le développement, la maturation et la fonction de ces neurones. En plus des protéines de taille attendue par la structure des gènes *Dlx*, des protéines de petite taille sont produits par chacun des gènes *Dlx*. En l'état actuel de nos connaissances, on ignore si ces différentes formes ont un rôle fonctionnel, ou si seul le niveau d'expression des gènes *Dlx* « longs » est important pour la régulation des fonctions cognitives. Comprendre les fonctions respectives des protéines courtes et longues est crucial pour comprendre le fonctionnement cérébral.

Le fonctionnement cérébral est un processus complexe qui ne peut ni être 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 les différents aspects de la régulation du fonctionnement cérébral par des gènes *Dlx*, nous proposons d'établir une nouvelle lignée de souris chez laquelle la protéine *Dlx* « courte » sera produite en plus de l'expression normale du gène. 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. Nous pourrions ainsi comparer cette lignée d'expression de *Dlx* « court » à des animaux contrôles pour en étudier les conséquences.

L'expression de ce *Dlx* « court » est déjà présente chez l'une de nos souris transgéniques, dans un autre projet, sans que les animaux présentent de phénotype délétère. Cette nouvelle lignée de souris n'est donc pas, à priori, de nature à provoquer de phénotype délétère. 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 s'assurer qu'ils ne développent pas de phénotype dommageable. 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 partie expérimentale du projet a deux aspects : le premier consiste à observer le comportement des souris : spontanéité, aptitude à faire un nid, prise de poids, attitude vis-à-vis d'objets présents dans la cage, comportement alimentaire et social. Le but premier de ce projet est d'établir cette lignée de souris pour des études futures, plus poussées.

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 neuro-anatomiques, chaque prélèvement de cerveau effectué sera scindé en plusieurs séries dans le but de réaliser plusieurs observations différentes sur le même échantillon et réduire d'autant le nombre d'animaux sacrifiés. 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 environ quatre-vingt-dix sur la durée totale, de 2 ans, du projet. 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.

9925 Plusieurs études montrent que les polyphénols issus d'extraits de plantes ont des effets bénéfiques sur diverses fonctions physiologiques chez différentes espèces. Ainsi, il a été montré récemment que les œufs des oiseaux sauvages présentent des teneurs en antioxydants (vitamine E, caroténoïdes) de 5 à 10 fois supérieures à celles des oiseaux domestiques, ce qui pourrait avoir des conséquences sur la croissance de la descendance. Notre projet a pour but de déterminer l'influence des extraits de pépins de raisin riches en polyphénols sur la génération suivante. Notamment sur la croissance, l'engraissement, la croissance osseuse, ainsi que sur la concentration de biomarqueurs du métabolisme et sur les performances de ponte et la qualité du sperme.

Notre objectif est de déterminer si une alimentation plus riche en polyphénols peut avoir des effets bénéfiques sur la génération suivante. Pour cela nous souhaitons mener une étude sur le développement des organes, tissus et os, à l'aide des outils d'imagerie scanner et échographie. Pour cela nous utiliserons 2 groupes de 20 mâles (groupe contrôle, groupe exposé par des polyphénols) et 2 groupes de 20 femelles séparées. Les animaux seront suivis de l'éclosion à l'âge adulte (35 semaines). Les 4 groupes de poussins recevront la même nourriture après l'éclosion et seront nourris dans les conditions d'élevage classique. Les poules et poulets seront analysés au CT-scanner et échographie, des pesées régulières (tous les mois) et des dosages sanguins seront réalisés le jour de l'analyse par imagerie afin de relier les données d'imagerie à des données métaboliques. Les animaux seront endormis pour les analyses d'imagerie.

A 25 et 30 semaines d'âge, l'ensemble des poules (n=40) sera inséminé artificiellement avec du sperme issu de coq (groupe contrôle). 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 300 poussins pour les 2 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 donc de 40 poules, 40 poulets et 300 poussins issus de la génération suivante.

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 : Une analyse a été réalisée afin de réduire au maximum le nombre d'animaux.

Raffiner : Les poules et les coqs seront séparés et élevés au sol dans des conditions comparables à celles d'élevages classiques. Les animaux peuvent se voir. Les enrichissements mis en place sont essentiellement des blocs à piquer et des objets suspendus. Toute intervention sur les animaux (de la simple contention à la procédure expérimentale) sera soigneusement réalisée par un personnel compétent et expérimenté. Les animaux seront surveillés tous les jours y compris les week-ends. Le comportement, la prise alimentaire, et la croissance des animaux sont des indicateurs de leur état de santé.

9926 Les follicules pileux sont un élément important de la peau, dont le rôle ne se limite pas à la croissance des cheveux et des poils. Leur absence est en partie responsable de la sécheresse et du manque d'élasticité dans la peau reconstruite des grands brûlés. De plus, la perte de cheveux est considérée comme un enjeu majeur par l'industrie médicale et cosmétologique. Le follicule pileux suit un cycle de croissance et repos/chute finement orchestré, dépendant d'interactions entre différents types cellulaires constituant le follicule et la peau environnante. De nombreux laboratoires sont à la recherche de molécules capables d'activer la phase de croissance.

Nos résultats récents montrent pour la première fois que certaines cellules de la peau participent à la stimulation de la croissance folliculaire. L'objectif de cette demande est de valider in vivo ces résultats totalement originaux et à fort potentiel médical et industriel. L'ensemble de l'environnement

cellulaire et physiologique ne pouvant être parfaitement répliqué in vitro, le recours à un modèle animal mammifère est nécessaire.

Dans la première partie du projet, des souris seront dans un premier temps rasées sur le dos, puis des injections sous-cutanées de faible volume seront effectuées. Aucun effet autre qu'une repousse précoce des poils n'est attendu. Afin de réduire l'effectif des animaux utilisés, nous travaillerons sur 2 cohortes successives, chacune comportant 18 souris (3 groupes de 3 mâles et 3 femelles chacun, 1 groupe test et deux groupes contrôles). Si les résultats obtenus sur la première cohorte sont positifs, l'étude sera effectuée à nouveau sur le même effectif, pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. Total maximum : 36 souris C57Bl6/J.

Amendement : Suite à la première étude, nous modifions ce point 6 groupes expérimentaux ne comprenant que des mâles et des contrôles additionnels, avec des effectifs de 6 animaux par groupe, soit 18 animaux supplémentaires.

Dans une seconde série d'expériences, des injections sous-cutanées de cellules de peau mélangées à des microvésicules seront effectuées de façon similaire sur des souris dénuées de poils, afin de tester la formation potentielle de follicules pileux. Comme pour la première partie, les expériences seront réalisées dans un premier temps sur une cohorte de 24 souris nude (2 groupes tests, dont l'un mimant l'alopecie androgénique, deux groupes contrôles). Selon les résultats, ces expériences pourront être réalisées sur une seconde cohorte équivalente. Total maximum : 48 souris nude.

Au préalable de cette seconde étude, nous effectuerons une étude pilote pour déterminer le type de cellules à utiliser pour obtenir la meilleure action, d'origine murine ou humaine, sur 6 animaux.

Le nombre total de souris sera donc de 90 souris (36 souris C57Bl/6J, 48+6 souris nude) auxquels s'ajoutent 18 animaux supplémentaire du fait de l'amendement soit 108 animaux. L'ensemble des tests durera environ 9 mois.

Nous tendrons vers les objectifs préconisés de réduction du nombre d'animaux utilisés, de remplacement du modèle animal et du raffinement de la méthodologie utilisée de la manière suivante : (1) Le nombre d'animaux utilisé sera minimisé autant que possible par l'analyse de cohortes successives. (2) Rasage et injections sous-cutanées seront faits sous anesthésie. Les animaux seront logés dans les meilleures conditions possibles. Les souris seront examinées quelques heures après l'injection, puis quotidiennement, pour vérifier qu'elles ne présentent aucun signe d'inflammation (3) Les deux parties du projet nécessitent de reproduire l'environnement naturel des follicules pileux, formé d'adipocytes, de cellules endothéliales et dendritiques ainsi qu'une matrice extracellulaire complexe sécrétée par ces cellules. Ces différents éléments interviennent dans la production des follicules pileux, et un environnement équivalent n'a pas encore pu être reproduit in vitro. Nous utiliserons la souris, espèce de mammifère permettant de réaliser les deux parties du projet, grâce à l'existence de souris sans poil acceptant des greffes de cellules sans traitement immunosuppresseur.

9927 Le syndrome du côlon irritable (IBS) concerne 10% de la population mondiale, le plus souvent des femmes de 20 à 40 ans. Les symptômes peuvent apparaître dès l'enfance, et dans 10% des cas les syndromes apparaissent à la suite d'une gastro-entérite.

Les symptômes de l'IBS les plus fréquents sont des douleurs abdominales, des crampes, des ballonnements, des diarrhées et ou de la constipation, du mucus...

Actuellement, les méthodes alternatives in vitro et ex vivo permettant d'étudier la douleur viscérale dans son intégralité n'existent pas, c'est pourquoi le recours à l'expérimentation animale est nécessaire pour comprendre et traiter cette pathologie.

L'objectif de ce projet est d'une part de mettre en place et de valider un modèle de douleur viscérale et d'autre part d'évaluer l'effet de candidats médicaments sur la douleur colorectale induite par une distension rectale après sensibilisation avec un agent inflammatoire chez des rats. Cet agent sera administré une seule fois par voie intra-colique sous anesthésie générale et sept jours après la douleur sera évaluée en réponse à une distension colorectale.

Afin de répondre à cet objectif le nombre d'animaux utilisés sera de 250 rats à raison de 10 animaux par groupe (minimum nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs), le nombre de groupes étant fonction du nombre de molécules et/ou doses à tester. 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 à 4 rats par cage d'hébergement et un enrichissement sera introduit dans l'hébergement des animaux. L'état des animaux sera suivi quotidiennement par du personnel compétent afin de s'assurer de leur bien-être et de l'absence de point limite à savoir prostration, perte de poids, présence de crampes abdominale, présence de blessure, Après chaque intervention chirurgicale, une attention particulière sera apportée sur le réveil des animaux et l'absence d'agressivité vis-à-vis de ces congénères.

Si un animal présentait un point limite, il serait isolé et hydraté et mis en présence de nourriture dans la litière. Si son état ne s'améliorait pas dans les 48h, les expérimentateurs compétents excluraient l'animal de l'étude et l'euthanasieraient.

Ce projet comportera des procédures classées sévères, il nécessitera de ce fait une évaluation rétrospective.

9928 Les traitements antalgiques de la migraine chronique restent encore de nos jours insuffisants voire inefficaces. La migraine se caractérise par des crises de céphalées accompagnées d'une hypersensibilité à de nombreux stimuli (olfactifs, visuels, auditifs, tactiles) et de troubles digestifs (nausées). L'hypersensibilité tactile ou allodynie (stimulus mécanique léger ressenti comme une douleur) constitue un marqueur de progression de la migraine vers le stade chronique. Nous savons que les astrocytes (cellules nerveuses gliales qui collaborent avec les neurones) sont significativement impliqués dans la modulation des messages nociceptifs. Leur implication dans les douleurs inflammatoires et neuropathiques a été démontrée chez l'animal. Afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles dans la migraine, il apparait donc nécessaire de savoir si les astrocytes jouent un rôle significatif aussi dans les états migraineux. Sachant qu'il n'existe objectivement aucune méthode alternative pour ce type d'étude, nous proposons d'étudier l'implication des astrocytes dans un modèle animal (rat) de migraine par des injections systémiques répétées (1 injection / jour/ 5 jours) d'un donneur de monoxyde d'azote, l'isosorbide dinitrate (ISDN) connu chez l'homme pour déclencher des crises de migraine.

Les injections répétées de cette substance entraînent chez le rat une hypersensibilité mécanique cutanée à la douleur (allodynie). Cette allodynie est évaluée après stimulation mécanique et observation d'un réflexe de retrait.

Dans le but de savoir si cette hypersensibilité est liée à l'activation des astrocytes, nous testerons l'implication de certaines protéines gliales. A la suite des administrations d'ISDN nous mesurerons leurs taux sériques lors de prélèvements sanguins et, par une approche moléculaire (Western Blot), leurs changements d'expression à l'aide de prélèvements tissulaires de certaines structures cérébrales.

Les mesures porteront sur des groupes d'animaux soumis à un traitement ISDN aigu (1 injection) ou persistant (5 injections).

Le nombre de groupe d'animaux et celui de chaque groupe a été réduit au minimum nécessaire et suffisant pour discriminer un effet statistiquement significatif entre les traitements (analyse de variance à une ou deux voies et tests post-hoc paramétriques ou non paramétrique). Au total 24 rats seront nécessaires : soit 6 rats/groupe testés dans les 2 conditions aiguë ou chronique + 2 groupes témoins correspondants. Dans un souci de respect de la règle des 3R, les mêmes animaux seront utilisés pour réaliser les prélèvements sanguins et tissulaires. Tous les animaux seront mis à mort à la fin du projet. Les conditions du projet respectent au mieux "R" de raffiner puisque les rats sont logés en milieu enrichi avec suivi quotidien, les stimulations nociceptives sont limitées en intensité en durée (niveau minimal requis) sachant que les animaux ont la possibilité d'échapper au stimulus mécanique. De plus, les points limites définis (perte de poids de plus de 15%, altérations posturales et motrices.) sont surveillés sachant que les données antérieures comparables ne montrent pas d'effet sur le bien-être général et la capacité à satisfaire les besoins physiologiques de l'animal. Nos résultats doivent permettre d'identifier une nouvelle cible thérapeutique que constituerait l'activité des astrocytes dans le traitement de la migraine chronique.

9929 Jusqu'à récemment, il était admis que la colonisation initiale du tube digestif du nouveau-né commençait à la naissance. Pourtant des études expérimentales récentes suggèrent que la

colonisation microbienne du tractus gastro-intestinal débute durant la vie fœtale et se poursuit activement durant les premiers jours de vie. On considère à l'heure actuelle que cette flore bactérienne commensale pourrait contribuer au développement du système immunitaire dès le stade fœtal et qu'une altération du microbiote pourrait être associée à de multiples maladies. Les substances chimiques utilisées dans l'industrie et l'agro-alimentation sont de plus en plus présentes dans l'environnement, avec des effets potentiels sur la santé publique. Parmi les substances chimiques omniprésentes dans notre environnement, le bisphénol A, un perturbateur endocrinien, pourrait être à l'origine de dysbiose intestinale et avoir des conséquences sur l'homéostasie intestinale de l'adulte. Cependant aujourd'hui aucune étude n'a été menée sur l'effet d'une exposition au BPA durant la gestation sur le développement du microbiote fœtal et néonatal.

Pour répondre à cette question, il est nécessaire d'administrer du BPA à la mère au cours de la gestation et de réaliser des prélèvements en vue de caractériser le microbiote fœtal et maternel. Etant donné que cette approche ne peut pas être mise en œuvre chez l'homme, nous avons utilisé le modèle du fœtus ovin. Le modèle du fœtus ovin qui est le modèle de référence pour l'étude de la physiologie fœtale humaine sera utilisé pour caractériser le microbiote fœtal, identifier les mécanismes et l'origine de la colonisation microbienne et évaluer l'effet du BPA sur les microbiotes fœtaux et maternels.

L'étude sera réalisée avec 10 brebis gravides qui sont également incluses dans le protocole de la saisine « Apprentissage des techniques chirurgicales de prise en charge de l'hémorragie du post-partum (HPP) sur le modèle de la brebis gravide » qui s'applique à l'issue de la césarienne. Au cours de la période allant du diagnostic de gestation (40 jours) à la césarienne programmée au stade 130-135 jours, 5 brebis recevront un traitement quotidien avec du BPA pour simuler l'ingestion quotidienne de BPA alors que les 5 animaux contrôles recevront la solution de dilution du BPA. Le nombre d'animaux correspond au nombre minimum qui permet d'assurer une formation adéquate des obstétriciens aux gestes d'hémostase postpartum. Le nombre d'individus correspond aussi au nombre minimum permettant d'assurer la reproductibilité des mesures et la robustesse des paramètres estimés.

Le modèle animal utilisé autorise la réalisation de prélèvements répétés permet d'obtenir un grand nombre de données et donc de réduire considérablement le nombre d'animaux. La brebis est un modèle pertinent vis-à-vis de l'homme pour la physiologie de la gestation. La taille et le nombre de fœtus et leur stade de développement sont similaires à ceux de l'homme. La taille de l'utérus de la brebis gravide à terme et sa vascularisation sont proches de celles de la femme en fin de grossesse. L'exposition maternelle au BPA sera évaluée au travers de la caractérisation de la cinétique temporelle des concentrations plasmatiques en BPA suite à la première et à la dernière administration ainsi qu'à l'occasion d'un prélèvement sanguin hebdomadaire. L'impact du BPA sur le microbiote maternel sera évalué sur des échantillons de fèces ou issus d'écouvillonnage buccaux, cutanés et vaginaux réalisés à 4 semaines d'intervalle. A l'issue de la césarienne, des prélèvements de liquides biologiques fœtaux (sang, liquide amniotique), de contenu digestif, de méconium et de placenta seront réalisés afin de caractériser l'exposition fœtale au BPA et son effet sur le microbiote. Pendant toute la période d'étude les brebis seront hébergées dans des boxes collectifs (5 brebis par box) dans un bâtiment fermé et doté d'une ventilation naturelle et des conditions naturelles d'éclairage et de température. La paille, utilisée comme litière sera renouvelée toutes les semaines. Une anesthésie locale et générale, complétée par un traitement antalgique, sera mise en place pour la réalisation des césariennes.

9930

De plus en plus de données montrent un lien entre le microbiote (micro-organismes) intestinal et le développement du cerveau. Chez l'homme, la prématurité favorise un déséquilibre du microbiote intestinal, augmente le risque de développer de l'anxiété, des dépressions, de l'hyperactivité avec troubles de l'attention. Elle est aussi caractérisée par une séparation maternelle précoce en raison des soins intensifs que les prématurés reçoivent. Nous avons étudié chez des rats mâles Fischer l'impact de la colonisation par un microbiote intestinal de prématurés humains et d'une séparation maternelle (2 jours après la naissance 3h/ jour pendant 9 jours) sur le risque de survenue de troubles comportementaux. Nous avons ainsi observé une hyperactivité motrice chez le rat à l'âge adulte. L'analyse des substances excrétées dans l'urine des rats ayant reçu le microbiote de prématurés a

montré la présence d'isopropanol, composé uniquement produit par le microbiote intestinal. Des modifications de la concentration d'acides gras libres comme le butyrate ont également été mises en évidence dans les fèces des rats prématurés. Mais y a-t-il une relation directe entre la production de ces métabolites bactériens (isopropanol, butyrate) et l'hyperactivité motrice observée? Bien qu'une corrélation soit obtenue entre les taux d'isopropanol, de butyrate et l'hyperactivité motrice des rats, ceci ne constitue pas une preuve de l'existence d'un lien entre les 2 événements. C'est pourquoi, nous proposons d'administrer pendant 3 semaines à des rats Fischer ayant subi une séparation maternelle, différentes concentrations d'isopropanol et/ou de butyrate et d'analyser l'activité motrice des animaux. Les rats seront ensuite euthanasiés et le sang, le cerveau et les fèces seront prélevés pour des analyses biochimiques. Cette étude est une étape pour améliorer la prise en charge des prématurés. Il n'existe pas de méthodes alternatives pour réaliser ce travail tant qu'il s'agit d'étudier des interactions complexes au sein de l'hôte et le nombre minimum de rat (138) se justifie par les analyses comportementales et biochimiques effectuées qui nécessitent un minimum d'animaux pour être statistiquement exploitables. D'après notre expérience, la période de séparation, les injections intrapéritonéales, le test comportemental ne devraient pas occasionner d'atteintes de points limites. Cependant, les rats seront examinés tous les jours pendant la séance d'injection et pesés ainsi que leur nourriture 2 fois /semaine, si une baisse de poids corporel de plus de 20% est observée, si l'animal est léthargique, en boule, le poil hirsute, il sera euthanasié.

9931 De nombreuses disciplines de la recherche biomédicale ont recours à l'utilisation de souris portant une ou plusieurs modifications génétiques. Certaines lignées portent un caractère supplémentaire par addition d'un gène (lignées transgéniques) alors que d'autres sont déficientes pour un gène qui a été rendu inactif soit en permanence, soit sous l'effet d'un traitement chimique, soit sous l'effet d'un autre gène. Il existe actuellement plusieurs milliers de ces lignées de souris.

Par sécurité en prévention d'un accident d'élevage (arrêt de reproduction ou incendie...) qui pourrait conduire à la perte d'une lignée, ou lorsqu'une lignée de souris n'est plus utilisée dans un projet de recherche, elle peut être conservée sous forme congelée (cryoconservation). La congélation peut concerner des gamètes (spermatozoïdes ou oocytes) ou des embryons. La congélation de gamètes s'effectue en prélevant les organes génitaux sur des animaux euthanasiés. Les embryons sont eux produits par accouplements spontanés ou par fécondation in vitro, et congelés ensuite. Les lignées peuvent ensuite si besoin être revivifiées soit en décongelant les embryons et en les réimplantant directement dans des femelles porteuses, soit en décongelant les gamètes et en les utilisant pour réaliser une fécondation in vitro et obtenir des embryons qui seront ensuite réimplantés dans des femelles porteuses.

Les techniques de congélation et décongélation chez la souris sont en amélioration constante, de façon à obtenir de meilleurs rendements et recourir globalement à l'utilisation de moins d'animaux tant en congélation qu'en reviviscence post-décongélation. Ce projet consiste à enseigner les techniques et les protocoles de cryoconservation les plus récents et optimisés pour qu'ils soient adoptés et mis en œuvre dans les différentes institutions de recherche. Le projet s'inscrit dans le respect du principe des 3R car il permet de former les gens à la fois pour sécuriser leurs lignées à l'état congelé et réduire globalement le nombre d'animaux utilisés en évitant le maintien de lignées à l'état respirant alors qu'elles ne sont plus utilisées dans des projets scientifiques, et de le faire en utilisant globalement moins d'animaux.

Le projet comporte 4 procédures, 2 légères et 2 sans réveil.

Dans 2 procédures, les dommages infligés aux animaux sont limités à l'injection d'hormones à de jeunes souris femelles pré-pubères pour induire une ultra-superovulation (maturation et ovulation d'un plus grand nombre d'oocytes). Ces oocytes sont ensuite utilisés soit pour congélation soit pour fécondation in vitro avec du sperme frais ou réfrigéré ou congelé/décongelé obtenu à partir de mâles. Le niveau de sévérité est léger pour l'injection d'hormones aux jeunes femelles.

Deux autres procédures consistent à réaliser des techniques chirurgicales sur animaux anesthésiés et analgésiés : vasectomie de mâles et réimplantation d'embryons à des femelles porteuses. Le niveau de sévérité est sans réveil car les procédures sont réalisées sur animaux anesthésiés et analgésiés, et mis à mort avant réveil à la fin de la procédure.

La durée du cours est de 1 semaine et sera répété annuellement pendant 3 ans. Ce projet conduira, sur 3 ans, à l'utilisation d'au maximum 1068 souris.

9932 Notre étude porte sur les mécanismes de migration de cellules dans des processus physiologiques et pathologiques de l'intestin. L'intestin est composé de villosités intestinales en forme de doigts de gant qui permettent l'absorption des nutriments. La villosité intestinale comprend deux compartiments : la crypte intestinale, située dans le bas de la villosité qui comporte les cellules souches et la villosité en elle-même qui est composée d'une muqueuse dans laquelle se situent les cellules dites épithéliales et de tissu conjonctif sous-jacent dans lequel se situent d'autres types cellulaires appelés cellules stromales. Ces deux compartiments sont séparés par une membrane dite basale. L'intestin a la particularité de se régénérer en 3-5 jours. Il est un bon modèle d'étude de la migration cellulaire puisque la division des cellules souches situées dans les cryptes intestinales donne naissance à cinq types de cellules qui vont en majorité migrer selon l'axe crypte-villosité pour être éliminés en haut de la villosité.

Notre laboratoire s'intéresse aux mécanismes responsables de la migration de cellules épithéliales ainsi qu'au rôle des cellules stromales durant ce processus physiologique.

Pour répondre à cette problématique, nous utiliserons des modèles de souris transgéniques exprimant des protéines fluorescentes impliquées dans la migration ou l'adhésion cellulaire.

Notre projet porte également sur le rôle du stroma dans les différentes étapes de la formation de tumeurs colorectales et de leur dissémination métastatique.

Notre étude porte sur 3 points :

- la compréhension des mécanismes de dégradation de la membrane basale (étape nécessaire à la dissémination tumorale) dans des tumeurs in situ
- le rôle du compartiment stromal dans la migration des cellules épithéliales tumorales vers les vaisseaux sanguins après la dégradation de la membrane basale.
- Et enfin le rôle des différentes sous-populations de cellules stromales impliquées dans les processus métastatiques.

Nous avons développé des modèles in vitro d'invasion cellulaire qui combinent des cellules tumorales à un sous type de cellules stromales appelé fibroblastes pour étudier la dégradation de la membrane basale. Les résultats obtenus in vitro doivent être validés dans un modèle in vivo car ces modèles cellulaires ne comportent pas la complexité de composition d'un stroma tumoral à savoir les différentes populations de fibroblastes, cellules immunitaires et la présence de vaisseaux sanguins. Pour ce faire, nous voulons utiliser un modèle murin de cancer colorectal qui a la particularité de développer des tumeurs intestinales comparables à celles développées par l'homme.

Durant cette étude, nous prévoyons d'imager des coupes intestinales de tissu sain ou tumoral grâce à une microscopie de grande résolution. Pour compléter ces résultats observés in vitro, nous analyserons les interactions cellules épithéliales-cellules stromales sur une souris anesthésiée à l'aide d'un microscope. Enfin l'injection de cellules épithéliales intestinales combinées à différentes sous-populations de fibroblastes dans l'épithélium intestinal de souris immunodéficientes nous permettra de comprendre les mécanismes métastatiques.

Pour l'ensemble de cette étude nous prévoyons d'utiliser 1311 souris sur 5 ans.

Ce projet est en accord avec la règle des 3Rs :

- Remplacer : Nous étudions le rôle du microenvironnement tumoral dans les processus invasifs. Pour cela, il a été développé au laboratoire des modèles cellulaires d'invasion en 2D ou 3D. Nous les utilisons en priorité par rapport à l'expérimentation in vivo. Toutefois, ces études in vitro devront être complétées par une analyse in vivo pour étudier l'influence d'un microenvironnement stromal tumoral dans sa globalité.
- Réduire : Le nombre d'animaux utilisés est ajusté au plus bas mais compatible avec l'obtention de résultats statistiquement fiables.
- Raffiner : Un enrichissement supplémentaire et une attention renforcée sont de mises afin d'assurer le bien-être des animaux et les expérimentations sont arrêtées avant la souffrance des animaux. Une grille de score permettra d'arrêter l'expérience selon des critères objectifs d'apparition de symptômes.

9933 L'exposition transitoire à de hautes altitudes (alpinistes, militaires) peut provoquer différents symptômes, dont des hémorragies rétiniennes. Celles-ci passent très souvent inaperçues, car les sujets n'en ont conscience que si elles affectent la région centrale de la rétine. D'après plusieurs études récentes, la fréquence réelle de survenue serait comprise entre 50 et 80% au-delà de 6000 m. Si ces hémorragies cicatrisent et régressent spontanément dans les mois suivant le retour, la perte d'une partie de la vision centrale et/ou une diminution de la vision périphérique inconsciente présente un danger réel pendant une expédition. De plus, des dommages irréversibles peuvent se développer si le séjour en haute altitude n'est pas interrompu.

Notre objectif est d'obtenir un modèle murin de rétinopathie de haute altitude (RHA) avec des caractéristiques physiopathologiques proches de celles rencontrées chez l'homme, afin de pouvoir tester des approches pharmacologiques préventives pour supprimer l'apparition des hémorragies. La RHA sera induite par exposition de souris à un niveau réduit d'oxygène, mimant les conditions rencontrées à 6000 m. Si peu ou pas d'hémorragies sont observées au bout d'une semaine, l'exposition sera prolongée d'une voire deux semaines. Si au contraire des hémorragies sont constatées sur tous les yeux à la fin de la première semaine, un second lot de souris sera exposé à un niveau d'oxygène correspondant à 4000 m. La rétine sera observée à l'aide de techniques d'imagerie sans contact utilisées chez l'homme et adaptées ici à la souris (tomographie par cohérente optique, fond d'œil et angiographie).

REDUCTION : Aucune hémorragie n'est attendue en conditions normales d'oxygène, nous utiliserons donc un test de comparaison de proportions. Un effectif de 6 souris de chaque sexe permettra - 1 - d'avoir un bon niveau de discrimination statistique (puissance > 90%, $p = 0.01$ dès 6 yeux touchés sur 24), - 2 - d'utiliser différents marqueurs de la barrière hémato-rétinienne et des cellules associées, et - 3 - de mettre en évidence une éventuelle différence de sensibilité entre sexe, si l'écart entre les proportions d'yeux affectés est de 50% ou plus entre mâles et femelles.

Afin d'éviter l'utilisation de souris supplémentaires, chaque souris sera son propre contrôle, avant et après exposition à l'hypoxie mimant la haute altitude.

Par rapport aux cas humains rapportés, l'altitude de 6000 m nous semble la plus à même de provoquer des anomalies dans 50-80% des cas. Si jamais la souris était plus sensible que l'homme, un deuxième groupe de 12 souris serait exposé à un niveau d'oxygène correspondant à une altitude de 4000 m. L'effectif maximal sera donc de 24 souris.

RAFFINEMENT : La baisse de la concentration d'oxygène sera effectuée progressivement (3 heures) pour ne pas provoquer de gêne chez l'animal. L'exploration oculaire est indolore - des expériences équivalentes sont réalisées chez l'homme sans anesthésie (qui n'est nécessaire chez la souris que pour empêcher les mouvements de l'animal.)

REMPLACEMENT : Un modèle mammifère nous semble nécessaire pour nous rapprocher au mieux de la pathologie humaine.

9934 Le travail de notre compagnie est principalement axé sur les maladies génétiques rares affectant les muscles. Plus particulièrement, notre but est de caractériser des modèles vivants, animaux, de maladies musculaires humaines (myopathies et dystrophies) et de tester l'éventuelle amélioration des signes de la maladie grâce à différentes thérapies.

Nous nous intéressons en particulier aux myopathies centronucléaires qui touchent aujourd'hui une naissance sur 50000 dans le monde et qui 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.

Nous avons précédemment montré qu'un niveau trop élevé de la dynamine 2 (DNM2) dans le muscle semblait jouer un rôle majeur dans la survenue de certaines de ces myopathies. Nous avons développé une thérapie utilisant un composé injectable capable de diminuer le niveau de dynamine 2. Dans un premier temps, nous avons validé cette thérapie chez des souris atteintes d'une certaine forme de myopathie. Chez ces souris injectées avec ce composé, nous avons observé un rétablissement quasi-total sur l'ensemble des signes cliniques de la maladie, et l'allongement de leur durée de vie. Nous avons dans un second temps testé l'efficacité de cette approche thérapeutique pour une autre forme de myopathie : la myopathie centronucléaire autosomique dominante (ADCNM).

Pour comprendre comment les modifications génétiques sont responsables de cette maladie, nous avons dans un premier temps utilisé des modèles cellulaires (REMPACEMENT). Nous prévoyons maintenant d'utiliser des souris reproduisant les signes cliniques de cette maladie qui sont observés chez l'homme. Ainsi, la grande similarité entre ce modèle de souris et la maladie humaine en fait un modèle idéal pour tester nos thérapies pour soigner la maladie. Les tissus et organes de ces souris seront aussi utilisés pour des expériences ultérieures in vitro (REMPACEMENT). De plus, les souris nous permettront d'étudier la performance physiologique des muscles, ce qui ne peut pas être étudié chez un modèle cellulaire (REMPACEMENT). Plusieurs procédures expérimentales (maximum une par 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. Ainsi, un maximum de 190 souris sera utilisé pour ce projet. 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).

9935 L'hypertension pulmonaire (HTP) est caractérisée par une élévation de la pression dans les artères pulmonaires. Il s'agit d'une maladie rare mais grave qui conduit au décès des patients. Pour essayer de développer de nouveaux traitements plus efficaces que ceux qui sont disponibles actuellement sur le marché, nous étudions une protéine qui s'appelle le facteur de croissance des nerfs ou NGF. L'élévation de pression dans les artères pulmonaires provient notamment d'une contraction excessive (ou hyperréactivité) de ces vaisseaux chez les patients souffrant d'HTP. Dans de précédentes expériences, nous avons montré un rôle du NGF dans ce phénomène. Ce rôle pourrait impliquer une protéine qui s'appelle la connexine-43 (Cx43) et qui participe à la communication entre les cellules. En effet, en utilisant une substance qui inhibe l'activité de cette Cx43, on perd l'effet du NGF sur la contraction des artères pulmonaires.

Ce résultat doit être maintenant confirmé d'une autre manière. Pour cela, nous souhaitons diminuer l'expression de la Cx43 dans les artères pulmonaires, et voir si on observe en parallèle une diminution de l'effet du NGF sur la contraction de ces vaisseaux. Cette diminution d'expression de la Cx43 sera obtenue chez le rat en injectant par voie intraveineuse (dans une veine de la queue) une substance appelée SiRNA. 48h après cette injection, les rats seront anesthésiés et nous étudierons si ce traitement a des effets sur leur pression artérielle pulmonaire et sur leur débit cardiaque. Les rats seront ensuite euthanasiés afin de prélever les poumons et de disséquer les artères pulmonaires. Nous vérifierons que le traitement a bien eu l'effet voulu et donc que la Cx43 est peu exprimée dans ces artères, puis nous étudierons l'effet du NGF sur la contraction de ces vaisseaux.

L'utilisation de rats dans ces expériences est indispensable. En effet, nous avons besoin d'artères pulmonaires « entières » pour étudier l'hyperréactivité de ces vaisseaux, car il s'agit d'un phénomène complexe qui ne peut être totalement reproduit en utilisant uniquement des cellules en culture. De plus, les résultats que nous voulons obtenir ont pour but de confirmer des résultats déjà obtenus sur des artères pulmonaire de rats. Cependant, nous avons réalisé une planification précise des expériences pour réduire au maximum le nombre d'animaux inclus dans cette étude, et nous proposons un projet portant sur 50 rats. Une attention permanente sera portée à leur bien-être avant et tout au long du protocole, en assurant leur surveillance quotidienne et un enrichissement de leur milieu (mélange de litière Lignocel® select fine et copeaux, tunnels, morceaux de bois à ronger). Pour réduire la douleur qui pourrait être ressentie par les rats au moment de l'injection intraveineuse, une crème contenant un anesthésique local (EMLA® 5% crème) sera appliquée au préalable sur la queue au niveau du site de l'injection. Les substances injectées n'ont jamais été décrites comme provoquant des douleurs et la souffrance est donc considérée comme faible dans ce protocole. Toutefois, les animaux seront surveillés de manière accrue pendant les 48h suivant l'injection, pour détecter tout signe de stress ou de douleur. Si nécessaire, une administration d'antalgique (carprofène) sera réalisée dans un premier temps. En cas de souffrance ou de détresse persistante pour l'animal, une procédure d'euthanasie par injection intrapéritonéale de pentobarbital et de lidocaïne sera mise en œuvre. Les mesures de la pression artérielle pulmonaire et du débit

cardiaque seront réalisées sous anesthésie (kétamine/xylazine) afin d'éviter un stress et/ou la perception de la douleur, et les animaux seront euthanasiés sans réveil à la fin de ces expériences par injection intrapéritonéale de pentobarbital.

Si les résultats obtenus dans ces expériences confirment nos résultats précédents, nous passerons ensuite à des expériences sur cellules humaines en culture pour comprendre les mécanismes reliant le NGF à la Cx43 dans la réactivité des artères pulmonaires. Ceci nous permettra ainsi de ne pas utiliser d'animaux dans cette partie de nos recherches.

9936 L'ischémie critique chronique est un défaut important prolongé d'apport sanguin du membre inférieur. Elle met en jeu le pronostic fonctionnel des patients (le taux d'amputation à 1 an étant de 30%) mais également le pronostic vital (le taux de mortalité à 1 an étant de 20%). Avec plus de 200 millions de personnes diagnostiquées dans le monde, l'ischémie critique chronique est un véritable problème de santé publique. Elle altère aussi, à distance, la fonction cérébrale. La dysfonction mitochondriale et le stress oxydant jouent un rôle majeur dans l'atteinte du muscle squelettique, et si certains exercices semblent protéger le muscle, nous avons peu de connaissances en ce qui concerne le cerveau.

Le présent projet nécessitera 60 souris Swiss. Nous utiliserons un modèle murin classique d'ischémie critique chronique (ligature séquentielle fémorale et iliaque) développé dans l'équipe car la fréquence de l'ischémie critique chronique est importante.

Les objectifs de ce projet sont de déterminer si l'exercice a un effet protecteur non seulement sur le muscle mais aussi sur les fonctions cognitives chez la souris atteinte d'ischémie critique chronique. Dans une perspective translationnelle, de telles découvertes et stratégies thérapeutiques pourront être proposées ultérieurement à l'Homme.

Nous avons veillé à respecter au maximum la règle des 3R :

Remplacer : Nous ne pouvons pas « remplacer » ce modèle animal par un modèle cellulaire puisque les altérations des tissus cibles lors de l'ischémie-reperfusion sont des processus complexes issus des interactions multi-tissulaires dans l'organisme.

Réduire : le nombre de souris est limité à 20 par groupe tout en conservant la puissance statistique nécessaire (3 groupes de 20 = 60 souris Swiss au total). Les tests statistiques sont adaptés aux paramètres à évaluer (tests de variance unidirectionnelle (ANOVA) suivis de tests post-hoc),

Raffiner : Les animaux seront suivis quotidiennement pour s'assurer de leur bien-être et de leur bon état de santé. L'eau et la nourriture seront à volonté, les animaux seront plusieurs par cage et des enrichissements seront à leur disposition. Lors de la chirurgie, les animaux seront surveillés en continu pour s'assurer de la profondeur de l'anesthésie et une analgésie pré- et post-opératoire sera mise en place. De même, un suivi quotidien des animaux sera réalisé prenant en compte la gestion de la douleur et des points limite selon une échelle bien établie.

9937 Le tryptophane (Trp) est un acide aminé essentiel, nécessaire à la biosynthèse des protéines. C'est également un précurseur biochimique de métabolites, qui ont des effets majeurs sur la physiologie des mammifères. Dans le tractus gastro-intestinal, le métabolisme du Trp peut suivre trois voies principales, qui sont toutes sous le contrôle du microbiote intestinal. Les produits finaux de ces voies jouent un rôle clé dans la modulation de la réponse immunitaire, des fonctions intestinales et du comportement. La pathogenèse de plusieurs maladies qui impliquent le microbiote intestinal est impactée par des métabolites du Trp, comme la maladie de Crohn ou la rectocolite hémorragique. Cela suggère que l'effet du microbiote dans ces maladies pourrait être, au moins partiellement, médié par un métabolisme du Trp altéré. Nous avons récemment observé qu'une dysfonction du métabolisme du Trp par le microbiote intestinal est impliquée dans la pathogenèse des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (modèle de colite induite par le Dextran Sulfate Sodium ou DSS) et des données préliminaires suggèrent un rôle potentiel dans d'autres grandes maladies humaines comme les syndromes métaboliques du type diabète de type II. Les objectifs de ce projet sont (i) d'identifier les composants du microbiote intestinal impliqués dans le contrôle des 3 voies du métabolisme du Trp dans l'intestin, et (ii) de déchiffrer l'équilibre réciproque entre les 3 voies pour évaluer le potentiel de leur modulation comme moyen thérapeutique.

Ce projet se déroulera sur 5 ans. Afin de répondre aux objectifs posés, nous utiliserons plusieurs modèles pour étudier différentes pathologies observées chez l'homme telles que des inflammations intestinales chroniques, comme la maladie de Crohn ou la rectocolite hémorragique (utilisation du DSS et de la bactérie *Citrobacter rodentium* pour induire une inflammation du côlon), ou des perturbations du microbiote provoquées soit par des traitements antibiotiques, soit par un régime alimentaire riche ou pauvre en tryptophane. Ces modèles seront appliqués soit à des souris témoins, soit à des souris invalidées pour un ou plusieurs gènes des 3 voies du métabolisme du tryptophane soit enfin à des souris invalidées pour le gène *Card9* (Caspase recruitment domain 9) chez lesquelles nous avons récemment montré que le microbiote était défaillant pour le métabolisme du Trp. L'essentiel des prélèvements (tissus, contenus intestinaux) sera fait post-mortem à l'exception du sang (le jour de l'autopsie) et des fèces.

Afin d'appliquer au mieux la règle des 3R, nous avons prévu dans nos projets scientifiques d'utiliser des expérimentations *in vitro* sur des lignées cellulaires ou des cellules primaires préalablement à l'utilisation d'animaux, ce qui permet d'en réduire le nombre. Nos études imposent le modèle animal pour valider les hypothèses soulevées grâce aux résultats des expérimentations *in vitro*. Il n'existe pas aujourd'hui de modèle *in vitro* récapitulant tous les paramètres du tube digestif. Nos groupes de souris seront réduits à 10 animaux par traitement testé. Le nombre de lignées de souris étant relativement élevé pour décrire les voies du métabolisme du Trp (1 lignée génétiquement normale et 7 lignées génétiquement modifiées : *IDO1*^{-/-}, *TPH1*^{-/-}, *AhR*^{-/-}, *IDO1xAhR*^{-/-}, *IDO1xTPH1*^{-/-}, *AhRxTPH1*^{-/-}, *Card9*^{-/-}) dans ce projet, nous utiliserons un maximum de 2640 souris, soit 528 souris par an sur 5 ans. Ce nombre d'animaux est calculé au plus juste en fonction de notre expérience antérieure pour garantir la qualité statistique des données. Les animaux sont hébergés au maximum à 6 souris par cage, dans une structure et des conditions parfaitement adaptées (litière changée régulièrement, eau et nourriture à volonté, température et hygrométrie régulées.). Nous allons veiller à enrichir le milieu de vie par l'ajout de feuille de cellulose dans les cages et d'un abri prévu à cet effet. Le suivi attentif et régulier des animaux sera réalisé afin de suivre l'évolution de la colite induite par les protocoles expérimentaux.

9938 Contexte : La méiose produit des ovules et spermatozoïdes, cellules sexuelles essentielles à la reproduction. La méiose chez la femme peut générer des ovules de mauvaise qualité. Cette tendance augmente avec l'âge : 20% des ovules sont anormaux avant 35 ans, 60% après. Ceci a des conséquences délétères sur la fertilité et produit des problèmes développementaux comme les trisomies. C'est un problème de santé publique dans les pays industrialisés où l'âge de la maternité recule, reflétant l'investissement des femmes dans leur vie professionnelle et entraînant un recours accru aux techniques de procréation assistée. La méiose est constituée de deux divisions cellulaires successives qui sont finement régulées pour empêcher des erreurs de séparation des chromosomes pouvant conduire à la formation d'ovules aneuploïdes (avec un nombre incorrect de chromosomes). Après la fécondation, de tels ovules aneuploïdes conduisent à des fausses couches ou à des trisomies. Ainsi, 95% des trisomies viables chez l'Homme sont dues à une mauvaise séparation des chromosomes dans l'ovule.

Objectif : Le projet a pour objectif de mieux comprendre comment est régulée la qualité des ovules, reflétée par la bonne séparation des chromosomes au cours de la méiose, en étudiant les propriétés mécaniques de ces cellules.

Modèle utilisé : Etant un processus spécifique des cellules sexuelles ovules et spermatozoïdes, la méiose femelle ne peut donc être observée que dans les ovules. En absence de culture de cellule de ce type, nous avons recours au modèle animal pour obtenir des ovocytes. Notre choix s'est porté sur la souris car c'est à la fois le modèle le plus proche de l'Homme et le plus accessible à l'expérimentation. Ce projet nécessitera l'utilisation d'environ 100 souris femelles adultes sur 5 ans pour les différentes techniques et conditions à tester pour répondre à nos problématiques.

Justification de la règle des « 3R » :

Nos protocoles, élaborés et utilisés depuis des années, nous permettent de réduire au minimum le besoin en souris pour répondre à nos problématiques. Les différentes conditions sont groupées au maximum lors d'une même expérience pour réduire le nombre de souris utilisées. Les expériences sont répétées dans la limite minimum nécessaire aux tests statistiques utilisés pour l'analyse des

résultats. Afin de réduire le recours aux injections d'hormones pour superovuler les souris (protocole semblable à ceux utilisés chez l'Homme en fécondation in vitro pour récolter les ovules), nous privilégions la maturation d'ovules in vitro, obtenus à partir de souris naturellement pubère (à partir de 9 semaines), mais la comparaison avec des ovules maturés in vivo reste indispensable pour valider les résultats.

Notre élevage est effectué dans une animalerie agréée qui respecte les dernières réglementations en vigueur (directive européenne n°2010/63/UE) et les principes de stabulation optimales. Le bien-être des souris est sous le contrôle d'une équipe d'animaliers compétents et formés à la détection et à la gestion des signes de stress animal.

9939 La présence de bactéries résistantes aux antibiotiques dans le tube digestif des animaux est un problème de santé animale et de santé publique. L'utilisation d'antibiotiques ou de certains additifs alimentaires peut influencer le portage de ces bactéries résistantes, par sélection ou contre-sélection. Il en est de même pour le portage de certaines bactéries virulentes.

Le but du présent projet est d'évaluer l'impact d'un additif alimentaire du commerce sur le portage digestif de souches inoculées d'*Escherichia coli* non pathogènes multi-résistantes et sur le portage de souches d'*E. coli* virulentes pour le poulet, ces dernières étant naturellement présentes dans l'intestin de poussins sains conventionnels. Trois cent soixante poussins de un jour seront répartis en 2 lots. Ces animaux bénéficieront de toutes les bonnes conditions d'élevage. Tous les oiseaux seront inoculés par voie orale avec deux souches d'*Escherichia coli* non pathogènes multi-résistantes. Un lot de poussins recevra l'aliment non supplémenté et l'autre recevra l'aliment supplémenté. Des prélèvements de matières fécales seront collectés une fois par semaine jusqu'à la fin de l'expérimentation à 42 jours d'âge des poulets. Dans chaque lot, vingt-cinq poulets seront euthanasiés à 21 jours d'âge et les animaux restants seront euthanasiés à 42 jours d'âge. Sur tous les oiseaux sacrifiés les caeca seront prélevés. Sur tous les échantillons (matières fécales, caeca), des dénombrements des *E. coli* résistants à différentes familles d'antibiotiques seront effectués et les proportions de *E. coli* virulents seront déterminées. Les valeurs obtenues pour les oiseaux recevant l'additif seront comparées à celles obtenues pour les oiseaux ne recevant pas l'additif afin d'évaluer l'impact de l'additif alimentaire sur la présence de bactéries résistantes et/ou virulentes dans la flore des poulets. Les résultats obtenus in vitro montrent que le recours à l'expérimentation animale est indispensable pour objectiver et comprendre l'impact de l'additif sur le microbiote. Compte tenu de notre expérience dans ce domaine, le nombre d'animaux est calculé de manière à obtenir des résultats significatifs en utilisant un minimum d'animaux par lot. Le protocole expérimental ne doit pas entraîner de souffrance animale, dans la mesure où 1) les inoculations et traitements sont faits par voie orale, 2) les souches de *E. coli* utilisées ne sont pas pathogènes chez le poulet et 3) les prélèvements effectués une fois par semaine n'engendrent pas de souffrance ou de stress chez les animaux. Enfin, des prélèvements d'organes seront également collectés sur les poulets après euthanasie en fin d'essai.

9940 La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est une maladie neurodégénérative fatale caractérisée par la dégénérescence des motoneurons de la moelle épinière qui contrôlent la contraction musculaire. Aucun traitement n'étant à ce jour disponible, il est crucial d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour lutter contre la SLA. Il a été montré que le nombre de récepteurs P2X4 activés par l'ATP augmente dans la moelle épinière des souris SOD1-G93A (SOD1), modèle animal de la SLA. Notre objectif est de comprendre le rôle des récepteurs P2X4 dans le développement de cette maladie. Pour cela nous souhaitons créer des souris SOD1 (modèle de la SLA) où les P2X4 seront soit complètement absents, soit en nombre plus important. Ces modèles seront créés en croisant les souris SOD1 avec des souris dont le gène pour le récepteur P2X4 a été éliminé (P2X4KO) et des souris P2X4mCherry dont le gène P2X4 a été modifié afin d'augmenter le nombre de P2X4 à la surface des cellules. Les expériences seront effectuées in vitro après sacrifice des animaux à différents âges et stades de la maladie afin de comprendre l'action des P2X4 dans la mort neuronale. Nous regarderons sur un nombre minimal d'animaux (12 par génotypes) si l'absence ou la surexpression des P2X4 modifie l'apparition des symptômes, les symptômes eux-mêmes et la durée de vie des animaux SOD1. Cela permettra de définir si P2X4 constitue une nouvelle cible

thérapeutique pour lutter à terme contre la SLA chez l'homme. La lignée SOD1 développe les symptômes de la SLA humaine. Aussi, pour le respect de la règle des 3R, l'élevage sera minimisé afin de ne produire que les animaux nécessaires. Pour la production des animaux, seuls les animaux dont le génotype est pertinent (SOD1 et SOD1 sans P2X4 ou sur-exprimant P2X4) seront conservés pour accouplement puis mis à mort avant l'apparition des symptômes. Les autres animaux non-utiles pour la production seront mis à mort dès que le génotype sera connu (2 semaines). Pour les animaux de protocole, nous prélèverons le tissu nerveux post-mortem à différents âges (40 et 75 jours) avant et au moment (100 jours) de l'apparition des premiers symptômes de la SLA pour effectuer des expériences in vitro. Afin de pouvoir comparer l'effet de P2X4 sur la progression de la SLA chez les animaux SOD1, un seul groupe de 12 animaux de chaque génotype sera maintenu jusqu'à l'apparition clinique de la paralysie des membres inférieurs (mesuré par leur incapacité à se retourner lorsqu'on place l'animal sur le dos) qui entraînera la décision de mise à mort immédiate. Pour les animaux conservés dès l'apparition des premiers signes de faiblesses motrices (point limite vers 90-100j) nous mettrons en place des mesures spécifiques et individuelles afin de faciliter la prise de nourriture et de boisson des animaux. Les lignées P2X4KO et P2X4mCherry ne présentent, quant à elles, pas de phénotype dommageable. Leur croisement avec les souris SOD1 devrait retarder ou accélérer l'apparition des symptômes et/ou modifier les symptômes des souris SOD1-G93A constituant tout l'intérêt du projet. Les changements observés sur les premières portées des nouvelles lignées entraîneront la redéfinition des points limites afin d'optimiser le bien-être des animaux. La création de ces lignées et croisements nécessitera environ 160 animaux pour une production de SOD1G93A-P2X4mCherry animaux (F3), 160 animaux pour les SOD1G93A sur fond C57 (F2 et F3) et 110 pour les SOD1G93A-P2X4KO (F2). Pour l'ensemble des expériences in vitro, 6 productions seront nécessaires soit un total d'environ 2500 animaux.

9941 La réalisation du présent projet intervient dans le cadre d'un besoin sociétal croissant concernant la prise en charge des individus vieillissants. Il s'inscrit dans la thématique générale du développement de stratégies préventives, visant à empêcher le déclin mnésique lié à l'âge où à améliorer la mémoire des individus âgés. Une de ces stratégies est la prévention par l'alimentation et notamment par l'apport de phyto-estrogènes. L'avantage évident de ce projet est de confirmer ou d'infirmer de nouvelles pistes en cours de développement, mais nécessite le recours à l'expérimentation animale.

Le but de ce projet est d'établir, chez des souris mâles et femelles C57Bl6 (i) l'implication du système estrogénique (les estrogènes et les récepteurs aux estrogènes) dans les altérations des processus mnésiques induites par le vieillissement et (ii) comment ce système contrôle la régulation de la plasticité synaptique structurelle et fonctionnelle dans l'hippocampe, structure cérébrale ayant un rôle clé dans les processus mnésiques altérés au cours du vieillissement.

Pour cela, les approches expérimentales principalement utilisées seront : 1) des analyses comportementales 2) des approches en électrophysiologie sur animal anesthésié et enfin, 3) des analyses biochimiques.

Par définition, ce projet ne peut être conduit sur des cultures de cellules ou de tissus. L'espèce animale choisie est la souris et ayant conscience de la nécessité de réduire au maximum le nombre d'animaux expérimentés tout en conservant une signification scientifique d'un point de vue statistique (hétérogénéité interindividuelle), le nombre de souris utilisé dans chacun des groupes expérimentaux variera entre 8 et 12 et le nombre total de souris utilisé sera de 1248 sur une durée totale du projet de 5 ans.

Dans notre cas, si la première étude consistant à réaliser un effet dose d'un composé pharmacologique sur la mémoire ne se révèle pas concluante, la seconde étude consistant à observer les effets du composé sur l'activité cérébrale ne sera pas envisagée. De même, une partie des séries expérimentales seront réalisées chez les mâles et les femelles. Tous les efforts seront portés afin de réduire le nombre d'animaux utilisés et de raffiner les approches utilisées afin de préserver au mieux leur bien-être durant les procédures. Les animaux seront hébergés dans des cages collectives enrichies jusqu'aux procédures expérimentales. De plus, la réalisation des expériences sera confiée à des utilisateurs expérimentés. Le présent dossier démontre par la suite

la conformité des expérimentations envisagées qui se feront en complète adéquation avec la directive européenne.

9942 Les plaquettes sanguines sont les principaux acteurs de l'hémostase primaire, processus physiologique permettant l'arrêt des saignements. Elles sont de petite taille (2µm de diamètre environ) et circulent sous forme discoïde. Cette morphologie est soutenue par un anneau de microtubules (MT) que l'on appelle bande marginale. Certaines pathologies s'accompagnant d'une perte de la forme discoïde sont liées à des anomalies de certains types de tubuline, les constituants des microtubules. Notre projet vise à étudier le rôle de certaines tubulines dans le mécanisme unique d'assemblage des MT dans la bande marginale des plaquettes et à terme d'améliorer le diagnostic et le traitement des patients présentant des maladies plaquettaires.

Le rôle de la tubuline beta5 est connu au niveau du Système Nerveux Central (SNC) mais pas dans la lignée plaquettaire où elle est également exprimée. Nous nous proposons d'étudier plus finement son rôle dans les plaquettes de souris déficientes pour le gène de la tubuline beta5 spécifiquement dans la lignée mégacaryoblastique. Les expériences consisteront d'une part en des prélèvements de sang pour réaliser des numérations plaquettaires, l'évaluation ex vivo de la biologie et de la morphologie des plaquettes et de leur réactivité, et la mesure du temps de saignement suite à une coupure au niveau de l'extrémité de la queue de l'animal. Nous serons attentifs à être en adéquation avec la règle des 3R.

Réduction. Une même souris sera utilisée pour plusieurs types d'expérience et comme nous maîtrisons l'ensemble des techniques mises en œuvre dans ce projet, aucune mise au point préalable n'est nécessaire. Le nombre d'animaux utilisés pour cette étude est calculé au plus près afin de permettre une analyse statistique des données (test de Student).

Remplacer. Les plaquettes sont formées à partir d'extensions anucléées de grosses cellules (les mégacaryocytes) principalement situées dans la moelle osseuse. Libérées dans la circulation sanguine les plaquettes se chargent en protéines plasmatiques pour devenir fonctionnelles. L'absence de noyau empêche la culture de ces fragments cellulaires in vitro. De plus les événements de maturation qui se déroulent dans la circulation sanguine une fois les plaquettes libérées nous imposent de les extraire à partir du sang d'un animal. C'est pour cela que l'utilisation de souris est incontournable.

Raffinement. Une attention particulière est portée au bien-être des animaux. Pour chaque procédure, les animaux sont anesthésiés et un traitement approprié contre la douleur leur est administré. Les conditions d'environnement sont optimisées par l'enrichissement des cages avec du coton compressé et de la frisure de papier ce qui leur permet de compartimenter leur environnement selon leurs besoins. Les animaux entre 2 et 6 par cage, ont un accès permanent à l'eau de boisson et à la nourriture.

L'étude se fera sur 64 souris.

9943 La prévalence de l'obésité s'est accrue de manière épidémique dans les pays développés. Compte tenu du lien étroit entre obésité et maladies métaboliques, cela pose un grave problème de santé publique. Résultant d'un déséquilibre entre calories ingérées et dépensées, l'excès de poids a souvent pour origine une perturbation du comportement alimentaire et/ou du métabolisme énergétique. Bien que les parts environnementale et génétique jouent un rôle indéniable dans ces perturbations, on sait maintenant que comportement alimentaire et métabolisme énergétique nous sont, en partie, dictés par notre héritage épigénétique. Ainsi l'alimentation d'un individu influencerait non seulement l'expression de ses propres gènes mais également celle des gènes de sa descendance. En utilisant le modèle murin comme modèle expérimental, nous avons récemment démontré que ce sont les molécules d'ARNs présentes dans les spermatozoïdes de souris obèses et diabétiques qui seraient les vecteurs de cette hérédité non-génétique. La question que nous nous posons maintenant est de déterminer si un tel mécanisme peut être généralisé à l'homme. Pour cette raison, nous réaliserons le même type d'expériences non pas avec de l'ARN extrait de spermatozoïdes de souris mais avec de l'ARN extrait de spermatozoïdes de patients obèses.

Ainsi, des souris adultes issus d'une autre animalerie et qui dérivent de la microinjection dans des embryons murins de molécules d'ARN extraits de spermatozoïdes d'hommes obèses ou non-

obèses seront reçues dans notre animalerie et analysées sur le plan métabolique. 3 tests seront réalisés : le test de Résistance à l'insuline (ITT), celui de tolérance au glucose (GTT) et un prélèvement sanguin. Notre travail porte sur la transmission paternelle de caractères nouvellement acquis sur un mammifère. Etant donné que les mécanismes moléculaires de ce type d'hérédité ne peuvent être analysés in vitro, nous utilisons parallèlement à notre modèle murin et en collaboration un modèle non-vertébré, *C. elegans*. Ce modèle nous permet d'étudier certains aspects des mécanismes moléculaires de cette hérédité (Remplacement). Cependant, ce modèle a des limites. Il n'est, notamment, pas possible d'analyser les effets métaboliques d'une alimentation riche en graisse. Afin de calculer la taille de l'échantillon nécessaire, nous avons réalisé un calcul de puissance, test qui permet de minimiser le nombre d'échantillons et donc d'animaux nécessaires pour valider ou non notre hypothèse de départ (Réduction). Dans un souci de Raffinement, nous mettons en place toutes les dispositions permettant de minimiser les souffrances éventuelles qui pourraient être associées à nos expériences : recours à l'anesthésie. Afin de réduire la contrainte imposée à chaque animal, les différents tests seront réalisés en respectant un intervalle d'au moins une semaine entre chaque test. Des analyses moléculaires et histologiques seront ensuite réalisées sur chaque souris. Nous prévoyons utiliser au plus 720 souris pour l'ensemble de ces travaux.

9944 Ce projet a pour objectif de produire des chiots Beagle mâle et femelle indemnes de Bordetella bronchiseptica, et, en fonction des besoins de Parainfluenza virus canine (CPiV), à l'âge de 3-4 mois environ, reposant sur des mesures d'isolement par rapport à l'environnement et d'antibiothérapie. Ces chiots seront ensuite utilisés pour le développement d'un vaccin vétérinaire. A chaque demande d'un client, 20 à 30 chiots seront produits avec des écarts de naissance de 14 jours maximum (prévision des dates de mise-bas par échographie). Les animaux seront maintenus avec les modalités d'élevage habituelles mais dans une zone dédiée maintenue fermée avec des précautions d'accès particulières pour le personnel. Des écouvillonnages nasaux et des prélèvements sanguins seront effectués sur les mères et/ou les chiots à différents temps pour la recherche de Bordetella spp. Des traitements antibiotiques seront administrés aux animaux (mère et/ou chiots) à la posologie recommandée par le fabricant lors de 3 phases différentes situées avant la mise bas et jusqu'au départ des animaux. Les interventions effectuées dans ce projet sont réalisées par des personnes compétentes et les techniques utilisées visent à limiter au maximum la douleur, la souffrance et l'angoisse des animaux. Les conditions d'hébergement sont adaptées au mieux pour répondre aux besoins des animaux. L'estimation du nombre d'animaux requis pour ce projet sur 5 années est de 300 chiens. L'utilisation de chiens sur ce projet est justifiée par le fait qu'ils représentent l'espèce cible du produit en développement et qu'il n'existe pas de méthode de remplacement pour ce type de test.

9945 Ce projet a pour but d'étudier l'un des mécanismes à l'origine de l'apparition d'hémopathies malignes chez l'homme. Les hémopathies malignes sont des affections de la moelle osseuse, tissu qui est responsable de la fabrication de l'ensemble des cellules du sang (globules rouges, globules blancs et plaquettes). Les hémopathies malignes regroupent un ensemble hétérogène de cancers des cellules sanguines ; on distingue les leucémies, les syndromes myélodysplasiques, les syndromes myéloprolifératifs et les lymphomes. Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) représentent la majorité des leucémies aiguës de l'adulte. Comme toutes les hémopathies, les LAM sont la conséquence de nombreuses anomalies génétiques acquises au cours du temps. Les conséquences fonctionnelles des événements « fondateurs » du cancer ne peuvent être pleinement appréhendées qu'au sein d'un organisme vivant ; en effet ces anomalies génétiques fondatrices influent sur l'expression de nombreux gènes qui eux-mêmes conditionnent le devenir des cellules en réponse aux multiples signaux extracellulaires présents chez un individu et au sein d'un tissu (hormones, facteurs de croissance etc...). L'utilisation d'animaux est incontournable pour évaluer l'importance des processus biologiques affectés par ces anomalies fondatrices. Pour ces raisons, nous établissons des lignées de souris génétiquement modifiées reproduisant les anomalies moléculaires d'intérêt et développant à terme des pathologies proches de la maladie humaine.

Dans ce projet, nous utiliserons un total de 229 souris pour étudier les conséquences de l'expression d'une mutation génétique qui fait partie des anomalies les plus précoces de la LAM. Nous développons un modèle de souris où l'expression de cette anomalie est activée à la période adulte. Cette anomalie sera exprimée dans l'ensemble de cellules hématopoïétiques de la souris (modèle de souris génétiquement modifiée « knock-in », KI). L'étude de cette lignée de souris nous renseignera sur les processus biologiques et les mécanismes moléculaires associés aux premières étapes de la transformation tumorale. Les données de la littérature nous indiquent que cette lignée murine, qui a déjà été utilisée pour d'autres études, permet l'apparition d'un phénotype avec une pénétrance complète ; cette caractéristique nous permet de réduire le nombre d'animaux inclus dans l'expérimentation.

Au cours de ce projet :

1. nous évaluerons les conséquences de cette anomalie génétique sur le développement des lignées hématopoïétiques chez l'animal jeune (avant 1 an) et chez l'animal plus âgé (>18 mois),
2. nous étudierons la potentielle coopération entre cette anomalie génétique précoce et une autre anomalie génétique connue pour être associée aux LAMs humaines, dans l'initiation et le développement de la maladie. La greffe se fera au niveau de la moelle osseuse, par injection des cellules en intra-fémorale. Cette approche favorise la prise du greffon et réduit le nombre d'animaux inclus dans l'expérimentation (comparé à l'injection dans la veine caudale ou à l'injection rétro-orbitale). Les points limite seront strictement appliqués. Toutes les interventions invasives seront faites sous anesthésie à l'isoflurane (prélèvements de sang) ou isoflurane / buprénorphine (injections aux animaux). Les animaux bénéficieront d'un environnement enrichi en tout temps. Du DietGel Energy sera ajouté dans les cages en cas de diminution de la prise alimentaire. Le nombre d'animaux choisis pour chaque lot représente le minimum requis pour constituer un échantillonnage représentatif, dans le respect du principe de réduction. Nous privilégierons dès que possible toute étude in vitro sur modèles cellulaires établis, ou sur cellules primaires de patients, nous permettant de valider nos hypothèses de travail (alternative de remplacement).

9946 L'objectif de ce projet est d'assurer le développement et le maintien des compétences du personnel dédié à la réalisation de modèles de rongeurs opérés pour répondre aux besoins des chercheurs dans le cadre de leur études et protocole de recherche.

Ces formations s'adressent à des techniciens expérimentés et dédiés aux activités de chirurgie.

La formation est composée de deux parties :

La formation initiale qui permet au personnel d'acquérir les gestes techniques permettant la réalisation de modèles chirurgicaux

La formation continue qui permet de maintenir et raffiner les compétences

-La formation initiale s'organise de la façon suivante :

Formation théorique à partir de l'instruction spécifique du modèle

Démonstration technique sur un animal

Entraînement sur un nombre défini d'animaux selon le modèle

Qualification après contrôle de la maîtrise du modèle

-La formation continue s'organise de la façon suivante :

Requalification sur le modèle si celui-ci n'a pas été réalisé depuis un temps défini dans notre instruction

Afin de proposer le nombre d'animaux requis répondant aux exigences du modèle, des animaux supplémentaires sont opérés. S'ils ne sont pas expédiés au client, ils sont euthanasiés et autopsiés pour valider la conformité du modèle.

Quel que soit le type de formation, les animaux 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 chirurgies pour la formation sont réalisées selon des procédures standardisées et adaptées aux spécificités de souche, sexe, âge et poids.

Rats et souris sont utilisés en fonction du modèle de formation. Notre activité fait que 90 % des animaux utilisés sont des rats. Le projet étant prévu pour 5 ans, ce nombre est estimé à 3375 rats

et 375 souris soit 3750 animaux pour former et maintenir les compétences d'environ 7 personnes sur environ 50 modèles.

Lors de la formation le bien-être animal est une priorité :

Entraînement sur animaux de réforme, morts ou anesthésiés sans réveil, lors de la ou des premières séances de formation

Analgésie systématique en péri-opératoire pour contrôler la douleur lorsque l'animal est maintenu en vie après la chirurgie

Asepsie systématique préopératoire

Soins post-opératoires, suivi clinique individuel en fonction des spécificités du modèle

L'utilisation d'animaux reste nécessaire pour s'assurer de la qualification des étapes post opératoires.

Points limites appliqués conformément à la procédure en vigueur.

9947 Le nombre de fumeurs de tabac est estimé à 1,1 milliard dans le monde. Le tabac est reconnu comme l'une des drogues les plus addictives, avec plus de 70% des fumeurs souhaitant arrêter et moins de 10% y parvenant sans soutien médical. Par ailleurs, si les thérapies de la dépendance au tabac peuvent être un soutien dans l'initiation de l'abstinence, elles ne sont efficaces que chez un nombre limité de patients et préviennent mal la rechute du comportement. Combattre la dépendance au tabac, c'est-à-dire aider les fumeurs à stopper durablement, est un défi sociétal majeur, car le tabac est à l'origine de maladies graves telle que le cancer du poumon. Il est nécessaire de développer de meilleures stratégies thérapeutiques et cela dépend de notre capacité à comprendre les mécanismes de la dépendance au tabac, dans lesquels la nicotine joue un rôle central.

Il apparaît de plus en plus évident que les fumeurs n'ont pas tous le même comportement, le même type de consommation, que les mécanismes ou les motifs de leur consommation peuvent être différents. La nicotine est le principal composé addictif du tabac et provoque une dépendance physique et une dépendance psychologique. Nous avons émis l'hypothèse que le rôle et le poids des dépendances physiques et psychologiques dans le maintien du tabagisme, varient selon les individus.

Le projet proposé tient compte des spécificités de la nicotine et a pour but d'étudier les différences interindividuelles dans les mécanismes psychobiologiques de la consommation de nicotine.

Au cours de notre projet nous porterons une attention particulière à la mise en pratique des principes éthiques fondamentaux (principes des 3R : Remplacement, Réduction, Raffinement).

Remplacement : Seul le modèle animal permet d'interroger les mécanismes neurobiologiques difficilement accessibles chez l'homme. De plus, l'étude du comportement addictif ne peut se réduire à la simple étude de l'effet de la drogue. Ce comportement met en jeu des mécanismes psychopharmacologiques complexes (conditionnement, perte de contrôle, impulsivité, compulsivité) qui ne peuvent pas être appréhendés par des modèles *ex vivo*.

Dans ce projet nous utiliserons un nombre total de 192 animaux, des rats non-consanguins, sur une période de deux ans. Le rongeur est en effet utilisé depuis 1960 pour modéliser la prise de drogue au travers de la procédure d'auto-administration intraveineuse.

Réduction : L'utilisation d'un trop grand nombre d'animaux est contraire à l'éthique, mais si trop peu d'animaux sont utilisés, l'expérience peut manquer de puissance statistique. Ainsi, compte tenu du risque individuel de dépendance, des différences individuelles dans la nature de cette dépendance, du pouvoir statistique limité des analyses corrélatives menées sur un nombre limité d'animaux, ainsi que sur la base des travaux déjà réalisés, nous évaluons à 96, le nombre d'animaux adapté pour ce type d'expérience. Deux expériences seront nécessaires. Elles permettront d'approfondir l'étude des différences interindividuelles dans les mécanismes psychopharmacologiques du comportement d'auto-administration et d'identifier des corrélats neurobiologiques de ces différences, au moyen de la mesure de l'expression génique pour l'une et de l'immunohistochimie pour l'autre.

Raffinement : Pour définir les dommages et contraintes subis par l'animal, nous avons établi une grille d'évaluation clinique et de surveillance. Pour réduire au maximum les conséquences de ces dommages, nous mettrons en œuvre les moyens suivants : enrichissement de l'environnement, soins pré-, per- et post-opératoires, administration d'analgésiques, manipulation quotidienne après

l'intervention chirurgicale, manipulation et examens biquotidiens avant et après la session comportementale, définition de points limites suffisamment précoces et mise en place de critères d'arrêt, phases d'habituations aux tests comportementaux. L'état de santé et l'attitude générale des animaux seront donc évalués individuellement 2 fois par jour. L'animal sera pesé une fois par semaine.

9948 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). De plus en plus, les patients recherchent des alternatives naturelles pour limiter la prise médicamenteuse ou diminuer l'intensité ou la fréquence des crises.

Certaines plantes comme la Grande Camomille ont une efficacité reconnue, mais limitée. L'agence européenne de la médecine a depuis longtemps reconnu l'efficacité de celle-ci (appelée aussi Tanacetum Parthenium ou Feverfew) pour soulager les douleurs de migraine. Il en est de même pour l'écorce de Saule blanc (Salix Alba) qui contient des dérivés salicylés comme la salicine, la salicortine ou les flavanones.

Nous souhaitons pour ce projet évaluer les effets de cette association et d'en comprendre son mécanisme 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 mâle, nous testerons l'hypersensibilité cutanée faciale développée à la suite d'injections intrapéritonéales (i.p) d'isosorbide dinitrate (ISDN, 10 mg/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 un symptôme très handicapant pour les malades. Nous proposons donc de tester les effets de cette association spécifique de plantes dans 2 conditions :

condition stade aigu (ce qui permet de tester l'effet curatif de cette association sur 1 injection d'ISDN)

condition stade chronique (ce qui permet de tester l'effet traitement chronique de cette association sur 4 injections d'ISDN).

Dans chacun de ces groupes, nous aurons un groupe témoin.

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 suivie d'un test post-hoc paramétrique si distribution normale ou test non paramétrique dans le cas contraire). Au total 45 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.

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. Cependant, toute observation indiquant une douleur persistante mettraient fin à l'expérimentation pour ces animaux. Par ce projet, nous entendons montrer l'efficacité d'une association spécifique de plantes qui agissent en synergie dans le cas de la douleur (allodynie) migraineuse aussi bien au stade aigu que chronique.

9949 Ce projet a pour objectif de permettre à nos clients de vérifier la tolérance d'un traitement appliqué sur le pelage, la peau, les muqueuses ou dans l'oreille d'un chien, sous la forme d'un topique (mousse, spray, solution, crème...) ou d'un shampooing.

Pour le développement d'un produit dermatologique à usage vétérinaire, les différentes formulations candidates doivent être comparées entre elles et/ou testées en condition aiguë (fréquence et dose de traitement élevées) afin de déterminer le meilleur traitement pour l'animal.

Chaque test sera réalisé comme suit : pour chaque formulation, jusqu'à 12 chiens seront traités à plusieurs reprises, et/ou à plusieurs fois la posologie recommandée par le fabricant.

Aucune réaction sévère n'est attendue, mais dans le cas de symptômes cliniques importants, sur avis vétérinaire, l'animal pourra être exclu du test avant la fin, si besoin un traitement adapté sera mis en place.

Pour diminuer le nombre d'animaux utilisés, les animaux pourront être utilisés pour plusieurs formulations différentes avec une période de repos suffisante entre chaque test.

La tolérance des formulations sera évaluée les jours suivants, par des examens cliniques et/ou observations pendant plusieurs jours. Les critères évalués seront l'innocuité générale (comportement de l'animal, signe digestif), les signes dermatologiques (érythème, excoriation, prurit, alopecie) et l'aspect du pelage (dépôt, amas de poils...).

L'estimation du nombre d'animaux requis pour ce projet sur 5 années est de 240 chiens, ce nombre pouvant être diminué par la réutilisation des animaux.

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.

9950 Les biomatériaux de substitution osseuse sont étudiés afin de développer des produits de substitution osseux utilisés chez l'Homme lors de fracture ne cicatrisant pas spontanément, afin d'obtenir une arthrodèse (intervention chirurgicale visant à immobiliser définitivement une articulation), de combler une perte osseuse trabéculaire dans certaines affections comme l'ostéoporose... Il est possible, dans ces indications, d'utiliser des autogreffes, des allogreffes voire des xéno-greffes. Toutefois, le volume de l'autogreffe est limité et il a été montré que le site de prélèvement est à l'origine chez un certain nombre de patients de douleurs importantes pouvant persister pendant plusieurs mois (11% à 1 an). Pour les allogreffes et les xéno-greffes, le problème de la stérilisation sans dénaturer la structure osseuse est primordial pour éviter la transmission de maladies et n'est toujours pas parfaitement résolu. C'est pourquoi, l'utilisation des biomatériaux de synthèse est une voie de développement.

Les biomatériaux que nous étudions font toujours l'objet d'études in vitro en préalable des études in vivo. Ces études in vitro permettent d'éliminer certains biomatériaux en raison d'effets délétères. Néanmoins, une étude in vivo est nécessaire avant l'utilisation en chirurgie humaine afin d'apprécier les effets et les interactions sur un organisme vivant. Il s'agit d'ailleurs d'une recommandation de la norme ISO 10993-6 lors du marquage CE. Le Lapin, les petits ruminants et le Chien sont les espèces les plus utilisées dans ces modèles in vivo.

Ces modèles animaux permettent d'étudier :

- * un nouveau biomatériau (face à un matériau de référence),
- * l'adjonction de principe actif ou de cellules à un biomatériau connu afin d'améliorer sa bioactivité,
- * l'effet d'un traitement par voie parentérale concomitant à ces implantations...

Ce projet utilisera des lapins : animal facile à manipuler et de taille suffisante pour tester la biocompatibilité des matériaux.

L'application de la règle des 3R sera effectuée comme suit :

Les biomatériaux implantés font l'objet d'une étude préalable in vitro avant d'être implantés chez l'animal afin de réaliser une première sélection.

Le nombre d'animaux est réduit au maximum grâce à l'utilisation de statistiques non paramétriques et en veillant à réduire la variabilité. Les tests statistiques non paramétriques permettent de travailler sur des effectifs faibles et ainsi de réduire le nombre de lapins utilisés. Sur la période de 5 ans, 90 lapins seront utilisés.

La réalisation des interventions par des chirurgiens vétérinaires expérimentés permet de réduire le traumatisme chirurgical. Outre la gestion de l'analgésie pré- et post-opératoire, l'état général et clinique des animaux est surveillé de façon quotidienne par le personnel animalier et par un vétérinaire pour estimer une éventuelle gêne ou douleur. Cette évaluation journalière permet la mise en place, si nécessaire, d'un traitement le plus précocement possible. Les animaux seront hébergés selon la réglementation en vigueur avec un enrichissement du milieu.

9951 La paralysie cérébrale (PC) de l'enfant est un handicap grave (incidence 2 à 3/1000 naissances) et pour l'instant intraitable lié à une ischémie cérébrale néonatale. Des essais cliniques à l'aide de cellules souches mésenchymateuses (CSM) ont été réalisés car ces cellules sont connues pour stimuler la réparation du tissu nerveux après leur administration. Cependant, les limitations majeures de la plupart des études non cliniques et cliniques restent le manque de caractérisation des cellules implantées, la survie des CSM implantées, et leur accès au sein même du tissu cérébral. Nous avons développé une approche permettant de dépasser ces limitations en fournissant un support polymérique en 3-dimensions aux cellules lors de leur administration au plus près de la lésion, la substance blanche périventriculaire. Cette approche, associant une sous-population homogène de cellules portées par des « microcarriers » biodégradables, permet d'augmenter la survie de cellules transplantées et leur efficacité dans différents modèles murins des lésions cérébrales. L'ensemble constitue un Médicament de Thérapie Innovante (MTI). Avant de réaliser la première étude clinique, nous devons confirmer nos résultats et l'absence de complications dans un modèle de gros animal reproduisant les lésions de la PC. Nous avons choisi le porcelet car son cerveau possède des circonvolutions et un rapport substance blanche/substance grise très proche de celui de l'homme. Le développement du système nerveux est aussi similaire à celui de l'homme, il est ainsi considéré comme un bon modèle en recherche neuropédiatrique. Nous allons d'abord caractériser la lésion ischémique et ensuite utiliser ce modèle pour réaliser les objectifs de l'étude, qui sont : 1) de montrer la survie des cellules souches après implantation intracérébrale dans le modèle porcelet de PC ; 2) d'évaluer la capacité du MTI à réparer une lésion ischémique et d'étudier la réaction cellulaire à l'implantation du MTI dans le cerveau. Pour réaliser cette étude d'une stratégie chirurgicale, nous allons utiliser un total de 28 porcelets de race Large White. Dans le cadre des 3R ; i) remplacer : le recours aux porcelets néonataux est indispensable car notre étude nécessite de travailler sur un gros animal dont la taille, la physiologie et la maturation cérébrale sera proche de celle de l'homme. Le porcelet est un modèle unanimement reconnu dans la littérature, la seule autre alternative est le primate non-humain ; ii) réduire : le nombre d'animaux est calculé pour avoir suffisamment de points d'analyses et de résultats exploitables, et est suffisamment faible pour ne pas imposer des souffrances à d'autres animaux. De plus, la méthodologie associe des imageries et des contrôles histologiques pour multiplier les points d'analyse sans augmenter le nombre d'animaux; iii) raffiner : l'implémentation de chaque étape du projet sera soumise à la validation de l'étape précédente. La chirurgie se fait sous anesthésie par un neurochirurgien et les animaux sont monitorés tout au long de l'intervention qui est de courte durée. On assure aussi des conditions de confort et de sécurité pour les animaux et de reproductibilité optimale. Les points limites de souffrance sont anticipés et l'animal sera euthanasié s'il atteint ce point limite. Dans un premier temps, nous allons développer un modèle de lésion ischémique de la substance blanche périventriculaire et nous allons nous assurer de la reproductibilité du modèle mis en place. La chirurgie est la même que celle réalisée couramment chez l'homme connue pour être peu douloureuse pouvant être réalisée sous anesthésie locale. Par la suite, nous allons implanter le MTI en intracérébrale au plus près de la lésion dans le but de la réparer. La preuve de concept de l'efficacité de ce MTI chez le modèle de porcelet permettra de mieux établir le bénéfice apporté par cette stratégie de réparation déjà démontrée chez les rongeurs. Une fois la preuve de concept obtenue, nous pourrons continuer avec le développement de ce MTI pour une étude clinique de phase I/II chez l'enfant.

9952 Plus de la moitié des patients souffrant d'un cancer reçoivent un traitement par radiothérapie. Cependant certaines tumeurs cérébrales dont les glioblastomes récidivent dans les champs d'irradiation, principalement suite à une faible réponse des cellules tumorales à la radiothérapie. Identifier les voies moléculaires régissant ces mécanismes de résistance à la radiothérapie permettra de synthétiser des inhibiteurs de ces voies utilisables en clinique humaine pour accroître l'efficacité de cette thérapie.

Nous avons identifié dans des cellules de glioblastomes cultivées in vitro une protéine Rad18 impliquée dans les mécanismes de radiorésistance de ces cellules. Nous avons fait la preuve de concept in vitro que, le blocage de cette voie biologique permettrait de rendre la radiothérapie plus efficace.

Chez le patient les cellules tumorales se développent dans un microenvironnement vascularisé, contenant d'autres types cellulaires, au contact duquel elles se modifient, s'adaptent, 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 le modèle murin Rad18 déficient, dans lequel seront implantées des xénogreffes orthotopiques afin de valider in vivo les études in vitro. Après irradiation focalisée sur la tumeur, nous nous attendons à observer une diminution ou un blocage de la croissance tumorale beaucoup plus important dans les tumeurs qui seront invalidées pour la cible d'intérêt. Ces essais précliniques conduiront, au sein de notre équipe spécialisée en recherche translationnelle, à la réalisation d'essais cliniques associant des inhibiteurs de cette voie à la radiothérapie chez les patients porteurs de glioblastome.

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 pour avoir une significativité statistique. L'hétérogénéité de la prise tumorale, de la croissance des tumeurs chez les animaux et de la réponse à l'irradiation nous oblige 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 sont nécessaires pour valider la cible identifiée in vitro : groupe contrôle, groupe irradiation, groupe avec inhibition de la cible et groupe irradiation et inhibition de la cible.

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 neurologiques ou de souffrance. Les animaux seront mis à mort dès l'apparition de signes neurologiques ou de souffrance par surdosage anesthésique. Toutes les manipulations qui pourront être stressantes ou douloureuses pour l'animal seront réalisées après anesthésie (induction des tumeurs, irradiation des animaux).

Ce projet sera réalisé sur 5 ans, soit un nombre total de 100 souris au maximum, afin de comprendre le rôle de la protéine Rad18 dans la radiorésistance, de valider la cible identifiée et d'obtenir des valeurs d'efficacité statistiques permettant un développement clinique ultérieur. Nos projets sont régulièrement évalués par la communauté scientifique à travers des appels à projets nationaux ou internationaux, des publications et localement lors des réunions internes à notre centre.

9953 En 2010, les maladies cardiovasculaires causèrent 16 millions de décès à travers le monde (Data OMS), soit 29.5% de la mortalité. Ce morbide fardeau persiste car le besoin médical cardiovasculaire n'est pas intégralement couvert par les thérapeutiques disponibles à ce jour, de nouvelles approches sont nécessaires.

Ce projet a pour objectif de sélectionner parmi les composés synthétisés par les chimistes, ceux qui allieront les plus grandes efficacités et sécurité. Le cœur et les vaisseaux étant le centre d'un système dynamique qui délivre le sang à tous les organes d'un Homme, la recherche et l'essai de nouveaux composés ne peuvent se passer de cet aspect dynamique uniquement présent et comparable chez les mammifères supérieurs. Après une phase de sélections et de tri des composés in vitro, les composés les plus actifs sont évalués chez le porc. L'objet de ce projet est la sélection et la caractérisation des candidats médicaments sur le porc. Nous procéderons en trois étapes ; en premier lieu nous évaluerons les composés sur des animaux sains à partir de paramètres simples de télémétrie, puis dans un second temps nous évaluerons les composés avec des explorations plus poussées au cours d'une expérience unique à l'état anesthésié (par ex, exploration pression-volume), et enfin nous testerons les meilleurs candidats-médicaments issus des deux premières étapes sur des animaux engagés dans un processus de modélisation des pathologies cardiovasculaires. Les modèles animaux de pathologies cardiovasculaires pourront être obtenus par l'administration de produits délétères ou par intervention chirurgicale. Les modèles utilisés sont reproduits de la littérature.

Ces tests sur les animaux interviennent après une phase de sélection in vitro des composés qui réduise de nombreuses étapes d'expérimentation in vivo par des modèles cellulaires assurant la réduction du nombre d'animaux utilisés au strict minimum. L'utilisation d'animaux pathologiques est

la dernière étape du processus qui ne concernera que 15% des animaux utilisés, dans le souci du bien-être animal et de pertinence clinique des modèles, il conviendra de réduire le stress, la douleur et l'inconfort des animaux en leur pourvoyant les antalgiques et les ménagements similaires à ceux que reçoivent les patients souffrant de maladies cardiovasculaires.

Dans le cadre de notre projet de recherche de nouveaux composés visant à traiter les maladies cardiovasculaires, nous prévoyons d'utiliser au maximum 1000 porcs sur 5 ans, qui regrouperont 800 animaux sains, utilisés pour les caractérisations primaires, 150 animaux modèles d'insuffisance cardiaque et 50 animaux pour les prélèvements de cardiomyocytes.

9954 La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est la plus fréquente des maladies musculaires (environ 1/5000 naissances males). Elle est causée par un défaut dans le gène de la dystrophine (chromosome X) et se traduit par une dégénérescence du tissu musculaire. La maladie touche tous les muscles, y compris le cœur et le diaphragme. Chez les patients DMD, la marche est définitivement perdue avant 15 ans et le décès survient généralement avant 30 ans. Il n'existe pas de traitement curatif à ce jour. La thérapie génique est une des approches envisageables pour le traitement de cette pathologie.

Avant le passage chez l'homme, l'efficacité thérapeutique des approches de thérapie génique est aujourd'hui validée à l'aide de deux modèles animaux : la souris mdx et le chien GRMD (Golden Retriever Muscular Dystrophy). Ces 2 modèles présentent un certain nombre d'inconvénients :

-La souris mdx ne reproduit que partiellement les lésions tissulaires retrouvées chez les patients DMD et est relativement peu malade (espérance de vie équivalente à une souris saine).

-Le chien GRMD présente des lésions tissulaires proches et une évolution comparable à la maladie retrouvées chez les patients DMD, mais reste un modèle de gros animal coûteux, lourd à manipuler et l'établissement de cohortes statistiquement significatives est quasi impossible.

En 2014, un consortium de laboratoires a généré un nouveau modèle animal de la DMD : le rat DMDmdx. Cette lignée se révèle être un très bon reflet de la pathologie humaine et peut donc se substituer au modèle canin, au moins pour réaliser les 1ères phases d'évaluation de l'efficacité de nouveaux produits thérapeutiques.

L'efficacité thérapeutique de la thérapie génique envisagée ici passe par le transfert dans les muscles, à l'aide d'un vecteur viral recombinant dérivé du virus adéno-associé (AAVr), d'un gène thérapeutique qui est une copie miniaturisée du gène de la dystrophine humaine, capable de remplacer le gène déficient et de produire une protéine « micro-dystrophine » (MD1) fonctionnelle. Le projet présenté ici a pour but de réaliser une étude de doses après injection intraveineuse chez le rat DMDmdx d'un vecteur AAV8 codant pour la μ dystrophine MD1 humaine afin de déterminer la gamme de doses pharmacologiquement efficaces (dose minimale efficace et dose biologique optimale). Cette étude permettra également de confirmer que l'AAV atteint le site (tissu / cellule) cible de l'anomalie, après injection IV. Le modèle animal utilisé sera donc le rat DMDmdx, dans lequel la fonctionnalité de ce vecteur a été récemment confirmée lors d'une étude pilote.

90 rats seront inclus dans ce projet. Quatre doses différentes du vecteur seront administrées en IV à des rats DMDmdx, ainsi que le véhicule à des rats DMDmdx et à des rats sains (groupe contrôle). Les animaux seront injectés à l'âge de 8 semaines et une cohorte sera suivie 3 mois et une autre 6 mois post-injection. La DMD étant une maladie évolutive et dégénérative, il est important de savoir si notre traitement de thérapie génique peut être efficace à plus ou moins long terme. La réponse à cette question aura des conséquences potentielles sur le design des essais cliniques prévus ensuite chez l'Homme. Un groupe supplémentaire sera en outre inclus dans cette étude : il s'agit d'un groupe contrôle « statut pathologique », comprenant des rats DMDmdx, non injectés, qui seront sacrifiés à l'âge de 8 semaines afin d'obtenir des tissus représentatifs du stade de la maladie à 8 semaines pour documenter, après analyse, l'état des lésions (muscles/cœur) "de base" à l'âge d'injection.

Des analyses exhaustives seront réalisées chez les animaux injectés pour évaluer l'efficacité du traitement au niveau histologique mais aussi phénotypique (suivi hebdomadaire du poids à minima, évaluation de la force musculaire et de la fonction cardiaque).

Le nombre d'animaux par groupe est basé sur notre expérience précédente de protocoles de thérapie génique lors desquels nous avons pu obtenir des résultats cohérents et reproductibles

dans des groupes de cette taille. Cela semble être un nombre minimal qui permette d'assurer la robustesse des résultats sans qu'il soit excessif en terme d'animaux à inclure. Une analyse statistique sera réalisée, en utilisant des tests non paramétriques de type Kruskal-Wallis.

Des protocoles d'anesthésie et d'analgésie seront mis en places en fonction des procédures expérimentales :

-Les injections IV du vecteur au niveau de la veine péniennne seront réalisées sous anesthésie (Etomidate (Hypnomidate®) en IP), précédée d'une prémédication analgésique (Buprénorphine (Véteergésic®) en SC). Les prélèvements sanguins pré-injection seront effectués à l'occasion de cette anesthésie.

-Les échocardiographies 2D seront réalisées sous anesthésie (Etomidate en IP).

-Les tests d'évaluation de la force (Grip test), seront effectués sur animal vigile.

L'évolution de la maladie en elle-même pouvant entrainer de la souffrance, l'état général de chaque animal sera surveillé de façon biquotidienne par le personnel animalier pour estimer une gêne ou douleur liées à l'expression clinique de la maladie. Ces observations seront fournies à un vétérinaire. D'autre part les rats sont hébergés selon la réglementation en vigueur, avec un enrichissement de l'environnement.

9955 La mise en place de l'asymétrie Droite/Gauche (D/G) qui contrôle le positionnement des organes (e.g. le cœur sur le côté gauche) est un aspect fondamental du développement animal. L'importance de ce processus est illustrée par des pathologies sévères résultant de défauts de latéralité. Entre 1/5.000 et 1/10.000 personnes souffrent en effet de défauts d'asymétrie D/G, entraînant nombre de défauts cardiaques congénitaux et des avortements spontanés.

Des études effectuées par notre équipe ont permis de mettre en évidence une activité importante des protéines Myosine-ID/IG et de leurs antagonistes Myosine-ICa/ICb dans la mise en place de l'asymétrie D/G chez le poisson zèbre, un modèle reconnu pour l'étude de pathologies humaines. En nous basant sur ces résultats, nous cherchons désormais à étudier l'effet de l'inactivation combinée de différents gènes *myo1* et à réaliser une dissection spatio-temporelle de leur activité. Le présent projet d'expérimentation décrit les procédures qui seront mises en œuvre pour générer des animaux adultes qui seront ensuite utilisés comme adultes reproducteurs pour manipuler l'activité de différents gènes *myosin1* chez l'embryon. Dans un souci de remplacement, l'effet de ces manipulations sur l'établissement de la latéralité sera ensuite étudié chez l'embryon au cours d'expériences qui - de par le stade du développement auxquelles elles seront effectuées - ne relèvent pas du domaine de l'expérimentation animale.

Deux procédures seront mises en œuvre dans le cadre de ce projet : 1, Le maintien d'animaux mutants dépourvus de l'activité de deux, trois ou quatre gènes du système *myosine1D/C*. 2, La création de lignées transgéniques pour la manipulation spatio-temporelle de différents gènes *myosine1*. Nous prévoyons ici un nombre de 9400 poissons zèbres utilisés en nous basant sur des estimations chiffrées motivées dans la demande. Dans un souci de respect de la règle des 3R ce nombre maximal d'animaux sera par la suite réduit en fonction des résultats obtenus à différentes étapes du projet. Dans un souci de raffinement des procédures, nous utiliserons des critères d'arrêt précoces basés sur plusieurs paramètres d'évaluation du bien-être animal.

9956 Les maladies chroniques du foie représentent la principale cause de développement du carcinome hépatocellulaire et sont associées au syndrome métabolique (surpoids, diabète, obésité, hypertension, dyslipidémie). Le spectre de ces complications hépatiques vont d'une stéatose simple (foie gras), à la stéatohépatite (Non Alcoholic Steato Hepatitis : NASH), puis à la fibrose, voire la cirrhose et à l'hépatocarcinome. Malgré l'importance clinique de ces maladies chroniques du foie, aucun traitement pharmacologique efficace n'est actuellement disponible.

La mise en place d'une inflammation à bas bruit dans le foie joue un rôle crucial dans le développement des maladies chroniques dans cet organe. Les cellules innées lymphoïdes (ILCs), les lymphocytes T et les macrophages font partie des cellules du système immunitaire impliquées dans les processus inflammatoires suite à un stress microbien ou métabolique. Ces cellules sont retrouvées entre autre au sein du tissu adipeux et de l'intestin, acteurs extra-hépatiques qui participent au développement et à l'évolution des complications hépatiques. Notre équipe de

recherche s'intéresse à la protéine CD44, molécule de surface impliquée dans les interactions cellulaires et qui régule le recrutement et les fonctions des cellules inflammatoires.

Nos récents travaux publiés ont montré un rôle clé de CD44 dans la mise en place de l'inflammation hépatique. Comme CD44 est exprimée par plusieurs sous-populations de cellules immunitaires, son invalidation spécifique dans chacune des cellules immunitaires que nous proposons d'étudier nous permettra d'identifier celle(s) dont les fonctions seront affectées et d'évaluer leurs rôles respectifs selon le stade de la maladie. Cela permettra aussi d'identifier des cibles thérapeutiques spécifiques du stade de la maladie. Ces cellules pourraient aussi servir de marqueur de diagnostic chez les patients atteints de complications hépatiques.

Pour satisfaire au remplacement, nous réaliserons des études préliminaires in vitro sur des lignées cellulaires de macrophages. Cependant, il nous est nécessaire de réaliser des études in vivo car les études in vitro ne permettent pas de reproduire les interactions complexes qui existent entre les différents organes et entre les différents types tissulaires.

Pour satisfaire à la réduction, nous utiliserons un schéma de croisement qui génère 50% de souris contrôles et 50% de souris invalidées pour CD44 ce qui évite la génération d'animaux inutiles. Nous prévoyons d'utiliser 720 souris sur une période de 5 ans.

Pour satisfaire au raffinement, nous serons particulièrement attentifs à tout changement physique ou de comportement. Leur bien-être sera scrupuleusement pris en compte dans toutes les procédures en termes de conditions d'élevage (température, hygrométrie), d'hébergement (présence de tige en coton et d'igloo dans les cages). Le suivi sanitaire quotidien assuré par les animaliers auquel s'ajoutent les visites régulières des expérimentateurs (au moins une fois par semaine en fonction des procédures) nous permettra de déceler précocement tout signe de stress ou de douleur et d'appliquer les points limites que nous avons définis pour chaque procédure.

Il est à noter que les souris déficientes pour CD44 ne présentent aucun phénotype dommageable comme observé au sein de notre animalerie et comme décrit par notre fournisseur de souris (souris viables, fertiles, de taille normale et ne présentent aucune anomalie physique et comportementale). Ces études seront réalisées avec un nombre maximum de 720 animaux sans compromettre les objectifs du projet et tenant compte des exigences de remplacement, réduction et raffinement. De plus, leur bien-être sera scrupuleusement pris en compte dans toutes les procédures en termes de conditions d'élevage (température, hygrométrie), d'hébergement (présence de tige en coton et d'igloo dans les cages), et de soins afin de réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les animaux.

9957 Notre laboratoire développe actuellement un axe d'ingénierie tissulaire vasculaire, c'est-à-dire que nous produisons des vaisseaux sanguins artificiels. Ces tubes artificiels nous permettront d'aller plus loin dans la compréhension du mécanisme de synthèse des vaisseaux (contractilité, réponse aux traitements vasculaires), et à plus long terme, pourront servir de greffons pour des patients atteints de maladies cardio-vasculaires qui nécessitent le remplacement d'un vaisseau sanguin.

Pour cela, nous souhaitons tout d'abord greffer ces vaisseaux et tester leur survie après greffe chez les souris immunodéficientes (sans système immunitaire pour éviter les rejets). Nous nous engageons à utiliser le minimum d'animaux nécessaires, que nous estimons à 660 souris sur le projet entier, sur 5ans.

Actuellement, les greffons proposés aux patients sont de 2 natures : des vaisseaux d'animaux (de porc essentiellement) qui présentent l'inconvénient de devoir être remplacés au bout de quelques années ou des vaisseaux synthétiques, qui nécessitent plusieurs mois de pré-greffe en sous cutané chez le patient dans le but de recoloniser le vaisseau avec les propres cellules du patient. Dans un cas comme dans l'autre ces deux techniques de greffes actuelles présentent un défaut majeur qui est la taille minimale des greffons qui ne peut descendre en dessous de 2-5mm. Notre technologie nous permet de synthétiser des vaisseaux « humains » et de taille variable et minimale de 100 micromètres de diamètre interne. Ils présentent donc une grande avancée technologique en terme de greffons vasculaires mais leur viabilité chez la souris doit impérativement être évaluée.

Nous nous engageons à évaluer le suivi quotidien du bien-être des animaux. Conformément à la législation et à la règle des 3R nous nous engageons également à réduire, raffiner, et remplacer au maximum le nombre d'animaux en réalisant le maximum de tests in vitro préliminaires (analyse des

tubes en culture, études et comparaison bio-informatique, analyses de la bibliographie existante) avant de passer à l'expérimentation animale. Nous mettrons en place des procédures pour réduire la douleur des animaux au cours de l'expérimentation : anesthésie et analgésie pendant la chirurgie, puis analgésie (sous la forme d'une injection de buprénorphine en sous-cutané 0,10 mg/kg) en cas de signe d'inconfort ou de souffrance.

Les animaux des études sont hébergés dans des conditions veillant au respect de leur bien-être (fratrie), sur de la litière en copeaux de peupliers et avec un milieu enrichi (jouet) afin de limiter leur stress. Les animaux sont suivis quotidiennement pour détecter tout inconfort ou souffrance. 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.

9958 Une mutation non-sens est une mutation transformant un codon en un arrêt prématuré de la traduction. Nous identifions au laboratoire des molécules permettant de forcer la machinerie traductionnelle à ignorer la présence des codons stop prématurés afin d'induire la synthèse de protéines de taille sauvage avec seulement un acide aminé différent par rapport à la protéine sauvage. Ces molécules représentent de potentielles approches thérapeutiques pour des maladies génétiques causées par des mutations non-sens ce qui représentent environ 10% des patients atteints de maladies génétiques. Nous recherchons des molécules capables de restaurer une expression fonctionnelle de gènes porteurs d'une mutation non-sens. Nous souhaitons donc pouvoir tester nos molécules dans un modèle murin afin de tester l'efficacité de nos molécules in vivo et de déterminer si la molécule passe la barrière hémato-encéphalique.

Le modèle murin qui sera utilisé porte une mutation non-sens dans le gène codant le récepteur mu aux opiacés. Ces souris sont appelées KIM. Pour cette étude de 5 ans, nous planifions d'utiliser 800 souris KIM. Ce projet est en conformité avec les exigences de remplacement puisque l'étude in vivo sur des modèles animaux sont indispensables avant le passage éventuel de molécules à visée thérapeutique vers des essais cliniques, de réduction puisqu'une phase exploratoire avec un nombre réduit d'animaux par lot (lot de 5) sera effectuée afin d'identifier la voie d'exposition, la concentration et la cinétique d'action de la molécule étudiée et ce afin d'abaisser au minimum le nombre d'animaux qui seront ensuite utilisés pour la démonstration de l'efficacité d'action de la molécule in vivo. Ce nombre sera de 40 ce qui correspondra à deux séries d'expériences avec 10 animaux par condition (avec et sans la molécule). La répétition de l'expérience est nécessaire pour s'affranchir d'un éventuel effet biaisé lié à la préparation de la molécule, au lot d'animaux ou à un stress survenu pendant l'expérience. Le nombre de 10 animaux par condition et par série afin de pouvoir réaliser ensuite un "student test" qui est le test utilisé dans les expériences permettant d'évaluer l'efficacité d'un traitement. Enfin, concernant le raffinement, l'expérience sera toujours menée de façon à prévenir ou à réduire au maximum toute souffrance. Ainsi, la voie d'exposition efficace la moins invasive sera privilégiée (le gavage par rapport à la pose d'une pompe osmotique par exemple).

9959 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 au niveau cérébral. Les traitements existant pour soulager les symptômes de cette maladie ne sont pas optimaux. Le développement de nouveaux outils thérapeutiques est donc essentiel.

Notre étude est basée sur l'utilisation du modèle rat de la maladie de Parkinson permettant de reproduire les symptômes typiques de la maladie de Parkinson et la perte de neurones dopaminergiques. Le principe repose sur l'injection intracérébrale d'une neurotoxine chez le rat qui cible et lèse ces neurones dopaminergiques. Le but étant d'évaluer l'efficacité d'un nouveau traitement pharmacologique sur le comportement moteur chez ces animaux « parkinsonien ».

L'analyse des effets pharmacologiques sur le comportement moteur nous contraint à utiliser des animaux. Le remplacement par des modèles in vitro actuels ne permettrait pas de répondre à notre question.

Afin de réduire le nombre d'animaux, tout en ayant assez de données pour établir des statistiques solides, 12 rats sélectionnés en fonction de leur résultats comportementaux (sur 16 au total) seront testés à 4 différentes doses de traitement et le contrôle.

Pour le respect du R de raffiner, les souffrances liées aux chirurgies seront soulagées via des molécules les plus adéquates. Tout le long des expériences, plusieurs critères sont pris en compte pour suivre le niveau d'inconfort ou de souffrance des animaux et décider, le cas échéant, de procéder à l'arrêt de l'expérience si le point limite est atteint. Les animaux seront mis à mort 10 semaines après les chirurgies. En fonction des résultats comportementaux, la dose de traitement efficace sera définie. Le sang et le cerveau seront prélevés à deux différents délai entre l'administration du traitement à la dose définie et la mise à mort (n=6 rat par délai) pour des analyses de pharmacocinétique.

9960 Une mutation non-sens est une mutation transformant un codon en un arrêt prématuré de la traduction. Nous identifions au laboratoire des molécules permettant de forcer la machinerie traductionnelle à ignorer la présence des codons stop prématurés afin d'induire la synthèse de protéines de taille sauvage avec seulement un acide aminé différent par rapport à la protéine sauvage. Ces molécules représentent de potentielles approches thérapeutiques pour des maladies génétiques causées par des mutations non-sens ce qui représentent environ 10% des patients atteints de maladies génétiques. Parmi ces maladies génétiques, on trouve la myopathie de Duchenne qui est causée par une absence de protéine fonctionnelle dystrophine. Cette absence peut être due dans environ 10% des cas à une mutation non-sens. Il existe un modèle murin porteur d'une mutation non-sens dans le gène dystrophine, ce sont les souris MDX. Nous souhaitons donc pouvoir tester nos molécules dans ce modèle murin afin d'évaluer l'efficacité de nos molécules in vivo.

Pour cette étude de 5 ans, nous planifions d'utiliser 1100 souris MDX. Ce projet est en conformité avec les exigences de remplacement puisque l'étude in vivo sur des modèles animaux sont indispensables avant le passage éventuel de molécules à visée thérapeutique vers des essais cliniques, de réduction puisqu'une phase exploratoire avec un nombre réduit d'animaux par lot (lot de 5) sera effectuée afin d'identifier la voie d'exposition, la concentration et la cinétique d'action de la molécule étudiée et ce afin d'abaisser au minimum le nombre d'animaux qui seront ensuite utilisés pour la démonstration de l'efficacité d'action de la molécule in vivo. Ce nombre sera de 40 ce qui correspondra à deux séries d'expériences avec 10 animaux par condition (avec et sans la molécule). La répétition de l'expérience est nécessaire pour s'affranchir d'un éventuel effet biaisé lié à la préparation de la molécule, au lot d'animaux ou à un stress survenu pendant l'expérience. Le nombre de 10 animaux par condition et par série afin de pouvoir réaliser ensuite un "student test" qui est le test utilisé dans les expériences permettant d'évaluer l'efficacité d'un traitement. Enfin, concernant le raffinement, l'expérience sera toujours menée de façon à prévenir ou à réduire au maximum toute souffrance. Ainsi, la voie d'exposition efficace la moins invasive sera privilégiée (le gavage par rapport à la pose d'une pompe osmotique par exemple).

9961 Après un traumatisme crânien léger (TCL), il est possible qu'il n'y ait pas de lésion cérébrale visible en imagerie par résonance magnétique (IRM) en dépit de troubles neurologiques ressentis, parfois même à long terme, par le patient. Il est donc important pour une meilleure prise en charge de ces patients de pouvoir objectiver l'existence d'une réelle souffrance cérébrale, à l'origine de ces troubles qui atteignent à distance la mémoire, la concentration, les fonctions exécutives, etc.

Dans cette étude, nous allons étudier l'intérêt de l'imagerie de la neuroinflammation par imagerie de tomographie par émission de positons (TEP). Les animaux subiront sous anesthésie générale un traumatisme crânien léger induit par un impacteur. La douleur suite à la survenue du traumatisme crânien léger est considérée comme légère : en effet, les observations initiales montrent que les animaux se déplacent et s'alimentent normalement, prennent bien soin de leur pelage, n'émettent aucun son et ne présentent aucun trouble du comportement. L'imagerie sera réalisée à 1 temps, 1 semaine ou 3 semaines après le traumatisme crânien. Ce temps sera déterminé auparavant par des expérimentations in vitro.

Remplacement : Ce type d'étude ne peut être substitué par une méthode alternative in vitro ou sur cellules car l'objectif final est d'utiliser cette méthode d'imagerie à visée diagnostique en clinique humaine.

Raffinement : Les animaux seront hébergés en groupe socialement harmonieux avec présence d'un enrichissement (tunnel et Nestlets).

Réduction : Pour cette étude nous utiliserons 10 animaux pour l'ensemble du projet sur 1 an, l'animal étant son propre témoin (on compare le côté lésé par rapport au côté intact du cerveau d'un même animal).

9962 La protéine T (pT) est une protéine qui joue des rôles fondamentaux dans la régulation de la prolifération des cellules. En effet, pT permet de stabiliser le génome des cellules et leur permet ainsi de proliférer de manière illimitée. Ainsi, pT est exprimé de façon anormale dans plus de 90% des cancers humains, toutes origines confondues. Plusieurs études ont montré que pT possède une autre activité (dite non-canonique) qui stimule les cellules souches des organes et les cellules cancéreuses. Ainsi, pT contrôle des processus biologiques fondamentaux, normaux et pathologiques, tels que la régénération des organes et le développement de cancers. Cependant, les mécanismes régulant l'activité non-canonique de pT restent méconnus.

Dans ce projet, nous proposons d'étudier le rôle d'une protéine phosphatase nommée protéine X (pX) dans la régulation de pT. En effet, des résultats préliminaires obtenus in vitro récemment dans l'équipe montrent que pX est capable de moduler l'activité canonique de pT. Dans ce projet, nous allons déterminer si pX est capable de moduler l'activité non-canonique de pT observée in vivo. Pour ce faire, nous allons utiliser des souris génétiquement modifiées permettant de moduler l'expression de pX et pT afin de (1) déterminer l'impact de la modulation simultanée de pX et pT sur le maintien des différents organes de l'individu adulte, et (2) caractériser l'impact de l'absence de pX sur la capacité de pT à activer la régénération dans le rein adulte. Ce projet permettra d'éclaircir les mécanismes responsables de la régulation de l'activité de pT, et fournira ainsi des connaissances cruciales pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques de médecine régénérative et de traitement des cancers.

Dans notre étude, nous allons utiliser plusieurs lignées de souris génétiquement modifiées, qui ne présentent pas de phénotype dommageable, mais qui seront croisées entre elles. Ainsi, des souris dans lesquelles pX est absente dès le développement de l'embryon seront croisées à des souris dans lesquelles nous pouvons induire la surexpression de pT chez l'adulte. Nous ne pouvons pas anticiper l'impact de la modulation simultanée de pX et pT sur le bien-être des animaux, et nous allons donc envisager la présence d'un phénotype dommageable chez ces souris lorsque ces deux protéines sont modulées, c'est à dire dès le début de surexpression de pT chez l'adulte. Dans le but de limiter l'impact de nos expérimentations sur le bien-être des animaux, nous avons mis en place un suivi strict et régulier de la douleur et du stress potentiellement engendrés par la modulation simultanée de pX et pT grâce à l'utilisation d'une grille de scores (Raffinement).

Pour réaliser ce projet sur 5 ans, nous utiliserons un maximum de 1728 souris. Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet a été déterminé afin d'obtenir des résultats statistiquement robustes à partir du nombre minimum d'animaux (Réduction). De plus, nos études in vitro sur la capacité de pX à interférer avec l'activité de pT sur la stabilisation du génome nous a permis de réduire le nombre d'animaux entrant en expérimentation. Malheureusement, il n'existe pas à l'heure actuelle de système in vitro permettant d'étudier l'activité de pT sur des processus biologiques complexes tels que la régénération des tissus.

Suite à cette étude in vivo, les analyses mécanistiques permettant de caractériser les modes d'interactions et d'interférences entre pX et pT seront réalisés in vitro sur des cellules en culture (Remplacement). Les expérimentations seront effectuées en limitant le niveau de stress des animaux, en particulier, en limitant au maximum l'isolement des souris pendant l'expérimentation.

9963 « Synucléinopathie » est le terme regroupant différentes maladies neurodégénératives humaines dont la maladie de Parkinson (MP), les démences à corps de Lewy et l'atrophie multisystémisée. La caractéristique commune de ces pathologies neurodégénératives est une accumulation anormale de la protéine α -synucléine sous une forme aberrante dans les cellules du système

nerveux central. L'accumulation de l' α -synucléine est impliquée dans la mort des neurones qui est observée dans certaines régions particulières du cerveau chez les patients atteints de ces maladies. Parmi ces maladies, la MP est la seconde maladie neurodégénérative la plus fréquente et ne possède à ce jour aucun traitement curatif. Elle est caractérisée par la perte extensive des neurones produisant un neurotransmetteur appelé dopamine et l'accumulation de l' α -synucléine dans les neurones du cerveau. Ces accumulations ont reçu le nom corps de Lewy. Nos travaux ont montré que cette accumulation se propage le long du système nerveux à mesure que la maladie progresse. Les symptômes sont caractérisés par des problèmes locomoteurs très lourds mais également non moteurs. Développer des outils thérapeutiques de manière à enrayer le développement de cette maladie chez les patients est un enjeu de santé publique majeur aujourd'hui.

Une des pistes est de trouver des stratégies pour réduire la toxicité de l' α -syn. On sait qu'elle subit une agrégation accélérée en présence de membranes riches en lipides, comme celle de nos neurones. Cette accélération perturbe les vésicules contenant la dopamine, conduisant préférentiellement à la mort des neurones à dopamine. L'endosulfine-alpha (ENSA) est une protéine présente dans le système nerveux central et qui interagit avec l' α -syn liée à la membrane. Nos données préliminaires montrent que l'ENSA pourrait atténuer la neurotoxicité induite par l' α -syn. Les efforts actuels visent à tester cette hypothèse dans un modèle in vivo de souris inoculées avec des corps de Lewy de patients atteints de la MP, traitées avec différentes formes de la protéine ENSA pour étudier leur effet chez les animaux avec des approches comportementales et d'études histologiques des cerveaux. Ce projet est donc d'intérêt pour toute pathologie liée à l' α -synucléine, et permettra donc de démontrer que l'utilisation de la molécule ENSA pour la diminution de la toxicité de l' α -synucléine est une cible thérapeutique valide pour les synucléinopathies.

Notre projet se déroulera en deux phases 1) une étude pilote avec 7 groupes de 3 souris C57BL6/J soit 21 souris qui permettra de déterminer les meilleures concentrations des différentes formes d'ENA à utiliser. Ces effets seront mesurés par des analyses histologiques 2) les données recueillies nous permettront de mener le restant de l'étude sur 8 groupes de 12 animaux, soit 96 dans les conditions optimales. Cette stratégie nous permettra de réduire le nombre des animaux à un total de 117. Cette stratégie nous permettra de respecter le R de réduire tout en ayant des groupes suffisamment conséquents pour pouvoir avoir des statistiques solides.

Notre approche expérimentale sera donc une injection stéréotaxique de Corps de Lewy et/ou des différentes formes de l'ENSA. Après un temps suffisant pour permettre la propagation de l' α -synucléine, la motricité des animaux altérée dans les modèles de synucléinopathie, sera évaluée par un test comportemental sans douleur, puis après la mise à mort des animaux, les cerveaux seront prélevés pour des analyses histologiques.

Pour le respect du R de remplacer, la mesure de la motricité ne peut se faire que sur des animaux. 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'antalgiques les plus adaptés à chaque procédure, optimiser les procédures soulager le stress des animaux et leur fournir les meilleures conditions de vie tout au long du projet. Pour leur bien-être, les animaux vivent en groupes sociaux et ont à leur disposition des éléments d'enrichissement de leur milieu. L'ensemble des animaux est surveillé quotidiennement avec une surveillance renforcée après chirurgie, et au cours des étapes de comportement, et 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. Au cours des étapes de l'apprentissage, les animaux sont légèrement restreints alimentaires, une surveillance accrue de leur poids et de leur état général et un accès immédiat à la nourriture au constat d'un mal être. 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.

9964 Les lots de vaccins à valence coqueluche à germe entier sont contrôlés dans le cadre de la surveillance de marché internationale réalisée par l'organisation mondiale de la santé (OMS) selon les référentiels réglementaires en vigueur. Les protocoles expérimentaux appliqués et les

spécifications relatives à la qualité de ces vaccins sont décrits dans les monographies de la Pharmacopée européenne. Ces méthodes 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, administration...) ce qui permet de réduire le nombre d'animaux utilisés en expérimentation animale pour vérifier l'efficacité de ces vaccins. Par ailleurs, dans la mesure du possible, nous nous efforçons de regrouper les analyses de produits afin de réduire le nombre de souris utilisés. 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 /ou de lamelles cartonnées ou des carrés de cellulose. La nourriture et l'eau de boisson sont contrôlés et disponibles ad libitum. Cette saisine est demandée pour une durée de 5 ans et utilisera un maximum de 5700 souris.

- 9965** L'éjaculation prématurée (ou précoce) est une dysfonction sexuelle masculine caractérisée par (définition de la société internationale de médecine sexuelle) :
- une éjaculation qui survient toujours, ou presque toujours, avant la pénétration vaginale, ou au cours de la minute qui la suit, et
 - une incapacité à retarder l'éjaculation lors de toutes ou presque toutes les pénétrations vaginales, et
 - des conséquences personnelles négatives, telles que frustration, soucis, souffrance psychologique et/ou l'évitement de l'intimité sexuelle.

L'éjaculation prématurée, qui peut occasionner une altération significative de la qualité de vie et des difficultés relationnelles dans le couple, représente la dysfonction sexuelle masculine la plus répandue, affectant 20 à 30% des hommes. Une cause organique à l'éjaculation prématurée est rare. L'étiologie, quoique très mal connue, est le plus fréquemment d'origine cérébrale. En France, à l'heure actuelle, un seul traitement médicamenteux (dapoxétine, Priligy®) a reçu une autorisation de mise sur le marché dans l'indication éjaculation prématurée. Il s'agit d'un inhibiteur de la recapture de sérotonine d'action centrale, appartenant à la même classe pharmacologique que certains antidépresseurs (Prozac®, Deroxat®...). Son efficacité, qui se traduit par la capacité à retarder l'éjaculation lors d'un rapport sexuel, demeure modeste et l'existence d'effets indésirables et interactions médicamenteuses potentielles laissent place à une amélioration du service médical rendu. La meilleure compréhension de la neurobiologie et neurophysiologie de l'éjaculation acquise ces 20 dernières années a permis d'identifier un certain nombre de cibles pharmacologiques pour moduler plus spécifiquement le contrôle central de l'éjaculation.

Le présent projet de recherche s'inscrit dans le cadre du développement préclinique de nouveaux principes actifs pour le traitement de l'éjaculation prématurée. La mise en œuvre d'un modèle expérimental validé est nécessaire à cette démarche. Reproduire le contrôle neurophysiologique central de l'éjaculation in vitro (remplacement) est impossible rendant ainsi indispensable l'utilisation d'un modèle intégré faisant appel à des animaux vivants. Des modèles d'induction pharmacologique de l'éjaculation chez le rat anesthésié ont été mis au point dans le laboratoire et permettent d'évaluer quantitativement l'effet de principes actifs sur la réponse éjaculatoire dans des conditions expérimentales standardisées. Du fait des connaissances des modèles/procédures liés au projet et de l'expérience du personnel y participant, il est possible de réduire le nombre d'animaux inclus dans un groupe traitement à n=12 (réduction) soit un nombre total de n=720 animaux pour l'intégralité du projet sur 5 ans. 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, en cas de traitement chronique au préalable à l'évaluation de la fonction éjaculatoire, un suivi quotidien de l'état général et du poids des animaux sera réalisé, pour une action rapide en cas d'état de souffrance.

- 9966** Les glomérulonéphrites (GN) à complexes immuns, comme la néphropathie à IgA ou la maladie rénale liée au lupus, sont un groupe de maladies du rein caractérisées par des lésions responsables d'une destruction du tissu rénal, entraînant ainsi une mauvaise filtration du sang et une accumulation de molécules toxiques dans le sang. Ces maladies peuvent être graves menant à une destruction

définitive du rein appelée insuffisance rénale chronique terminale (par conséquent la nécessité de dialyse ou de transplantation rénale) mais également un risque de décès des patients atteints.

Il n'existe actuellement pas de données claires sur les causes de ces maladies. Aucun traitement médicamenteux spécifique n'a donc pu être développé pour les guérir.

Le but de ce projet est donc d'identifier les molécules responsables de la destruction du rein dans plusieurs modèles de maladies rénales, afin de pouvoir les cibler spécifiquement par un médicament et empêcher ainsi le développement et l'aggravation de la maladie rénale.

Le premier objectif du projet est de comprendre le rôle de plusieurs protéines dans le développement de ces maladies rénales.

Il est donc essentiel de développer des animaux ayant soit la présence soit l'absence de ces molécules. Le modèle de souris que nous utilisons est le modèle appelé anti-GBM : il s'agit d'injecter aux souris des anticorps entraînant le développement de la maladie rénale. Nous analyserons ensuite l'effet de la présence ou de l'absence de telle ou telle molécule dans différents types de souris sur le développement de la maladie.

Ce projet se déroulera sur une période de 5 ans et nécessitera un nombre total de 714 souris.

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) Au sein de notre équipe, nous avons développé des lignées cellulaires qui sur-expriment les différentes molécules. Ces lignées vont permettre d'étudier le rôle de ces protéines dans la régulation de l'inflammation lors de ces maladies rénales. Cependant, pour étudier le rôle de ces protéines sur la fonction rénale, nous aurons besoin d'un modèle animal puisqu'aucun autre modèle (cellulaire) ne permet aujourd'hui d'évaluer la fonction rénale lors de ces maladies.

9967 L'introduction d'espèces non natives dans les écosystèmes va crescendo et, quand celles-ci s'établissent durablement, leur impact écologique peut être sévère et modifier considérablement les réseaux trophiques originels, voire contribuer à l'extinction d'espèces locales. Une bonne gestion des milieux aquatiques, conciliant la conservation de leur richesse (sauvegarde d'espèces patrimoniales), leur bon fonctionnement et la satisfaction des usages (activités halieutiques, irrigation, loisirs, qualité de l'eau) passe par la connaissance et la compréhension de l'écologie de ces espèces au sein de leur nouveau biotope et de l'impact qu'elles ont sur les écosystèmes.

Le Silure glane, natif d'Europe de l'est, est maintenant bien établi en Europe de l'ouest ; sa présence est avérée en région Provence-Alpes-Côte d'Azur où les températures chaudes semblent favoriser son implantation dans les grands cours d'eau comme le Rhône depuis les années 1980 mais aussi dans les plans d'eau. Ce prédateur de très grande taille, capable de consommer des espèces qui étaient jusque-là au sommet de la chaîne trophique, est susceptible de modifier la structure des réseaux trophiques.

En région méditerranéenne, où les pressions anthropiques sur les milieux aquatiques continentaux sont particulièrement marquées (réchauffement climatique, besoins humains croissants en eau douce), encore peu de données ont été récoltées sur les principales caractéristiques biologiques (croissance, fécondité et régime alimentaire) et sur la dynamique des populations de silure. Il en est de même sur les densités auxquelles on peut le rencontrer et sur ses caractéristiques comportementales, i.e. déplacements et préférences d'habitat liés à l'accomplissement des fonctions vitales de repos, d'alimentation et de reproduction, encore très partiellement décrites. Est-

il en compétition d'un point de vue alimentaire ou de l'habitat avec d'autres carnassiers emblématiques que sont le brochet, espèce patrimoniale dont le maintien est souvent menacé à cause de la réduction des sites de frayère, la perche ou le sandre, espèces d'intérêt halieutique reconnu ? Connaître la pression qu'il exerce sur d'autres espèces plus petites, exotiques (perche-soleil, écrevisses américaines, etc.) ou natives (gardon), peut également revêtir un intérêt du point de vue du fonctionnement général des systèmes (contrôle du développement algal par exemple). Le manque de connaissances sur l'écologie du silure nous prive d'informations capitales pour une gestion efficace de la dynamique de développement de cette espèce dans les milieux où elle s'est récemment bien installée. Il hypothèque également l'évaluation potentielle de l'impact de cette dynamique de population sur l'équilibre des peuplements natifs et donc sur le fonctionnement général des milieux déjà sous contraintes anthropiques.

Le présent projet vise à améliorer la connaissance de la biologie et de l'écologie de cette espèce et de son impact potentiel sur les espèces co-occurentes, éléments qui nourriront les plans de gestion à mettre en œuvre.

Pour cela, nous proposons, à partir d'une approche in situ sur une population établie en plan d'eau, de :

- caractériser, par télémétrie acoustique, l'utilisation de l'espace par le silure et notamment les zones préférentiellement fréquentées en période de reproduction, d'alimentation et de repos ;
- étudier les traits d'histoire de vie de l'espèce (croissance, position du silure au sein du réseau trophique - qui va renseigner sur le régime alimentaire -, fécondité et structure génétique de la population).

345 individus seront utilisés dans le projet, répartis ainsi : -75 silures se verront implanter un émetteur acoustique dans la cavité péritonéale pour suivre leurs mouvements ; -250 individus figurant parmi les proies potentielles du silure et sur lesquels sera prélevé un bout de nageoire. Il s'agit de 5 individus de chacune des espèces suivantes (pour capturer la variabilité des régimes alimentaires au sein de chaque espèce) : Brème bordelière (*Blicca bjoerkna*), Brème commune (*Abramis brama*), Brochet (*Esox lucius*), Carassin commun (*Carassius carassius*), Gardon (*Rutilus rutilus*), Perche (*Perca fluviatilis*), Perche soleil (*Lepomis gibbosus*), Rotengle (*Scardinius erythrophthalmus*), Sandre (*Sander lucioperca*), Tanche (*Tinca tinca*) ; -20 silures femelles matures seront euthanasiées en fin de projet pour estimer leur fécondité. Les 75 silures marqués avec un tag acoustique ainsi que les 250 proies potentielles sont relâchées et maintenues en vie dans leur milieu en fin de procédure. Les exigences de remplacement, réduction et raffinement sont prises en compte dans ce projet. Concernant le Remplacement, le modèle animal est nécessaire car il s'agit d'étudier le comportement des silures dans leur milieu. Le nombre d'individus, 75 en l'occurrence pour le suivi des mouvements et 20 pour la fécondité, est réduit au minimum nécessaire à la fois à l'obtention, de notre expérience de ce type de projets, d'un nombre suffisant de données réellement acquises au final pour effectuer des analyses statistiques robustes indispensables pour des résultats fiables et stables. Par ailleurs, toutes les manipulations d'individus que nécessite cette expérimentation se feront dans le respect le plus strict des animaux. Les individus pêchés sont stockés dans des bacs de stabulation avec bulleurs dont l'eau est régulièrement changée ; la durée de rétention est aussi minimisée avec des procédures menées globalement sur une demi-journée (de la capture au relâcher). Les opérations d'implantation d'émetteurs acoustiques intra-péritonéaux et de prélèvements de bouts de nageoires se feront sous anesthésie générale avec injection d'analgésique pour réduire au maximum la douleur et application d'un pansement antiseptique hydro-résistant.

9968 Cette étude porte sur un protocole chirurgical permettant d'effectuer un allongement osseux. Cette procédure est appelée chirurgie de callotasis et permet la création d'os afin de venir corriger la différence de taille entre deux membres. Ce type de problème peut survenir chez des enfants qui ont eu un problème au niveau de leur cartilage de croissance, ou suite à une pathologie de type nanisme ou encore dû à des retraits de tumeur osseuse. Le principe est de faire une fracture nette sur l'os que l'on souhaite allonger, cette induction de fracture est appelée dans le milieu médical ostéotomie. Ensuite afin de maintenir les segments osseux bien alignés, le chirurgien va venir installer un fixateur externe. Ce dispositif médical sera maintenu en place tout au long du protocole

d'allongement osseux. Suite à cette fracture induite et à la pose du fixateur, on va attendre naturellement que les premières étapes du remodelage se fasse, c'est-à-dire qu'on attend l'apparition d'un hématome qui est riche en tissus dit fibreux et de cellules permettant la réparation future de l'os. Cette dernière s'appelle la phase de latence. Ensuite on enchaîne avec la phase de distraction active, car comme elle le sous entend pendant cette période on va venir activer le fixateur. Autrement dit on va venir actionner le fixateur pour éloigner les segments osseux l'un par rapport à l'autre. On va venir effectuer cet éloignement très lentement afin de ne pas déchirer le nouveau tissu créé au sein de la fracture. Grâce aux données empiriques on sait qu'il faut activer le fixateur de manière à allonger d'1 mm par jour et ceci fait en 4 fois (donc $4 \times 0.25\text{mm}$) chez l'homme. Une fois l'allongement souhaité obtenu, la phase de consolidation commence. On laisse le fixateur en place mais on le bloque dans l'optique de laisser les cellules du corps faire la réparation de l'os. Et cela prend du temps il faut s'imaginer que pour 1mm d'allongement il faut attendre 1 mois pour que le corps humain arrive à le réparer. Et pour finir on retire le fixateur.

L'inconvénient de ce protocole est qu'il y a beaucoup de problèmes que l'on peut voir apparaître en cours de route comme des infections, des douleurs, des problèmes vasculaires, articulaires ou nerveux. En effet lors de l'allongement il faut penser que l'on vient également allonger tous les tissus environnant l'os. Dans notre étude l'inconvénient sur lequel nous sommes focalisés est la consolidation de l'os au cours de la dernière phase du protocole. Dans cette phase le corps humain va minéraliser les tissus anciennement créés. Il va permettre à l'os de reprendre une de ses fonctions principales qui est le support du poids du corps. Or dans 20 % des cas après le retrait du fixateur on constate soit une fracture soit une déformation de l'os. Et ces symptômes apparaissent soit directement après le retrait alors que le patient n'a pas appuyé sur son membre ou dans le mois suivant le retrait.

C'est pourquoi nous avons mis en place un modèle animal pour l'allongement osseux. Nous sommes obligés de passer par un modèle dit in vivo et non in vitro car l'environnement biologique complexe et mécanique ne peut être recréé par cette méthode. Après une recherche poussée de la littérature, nous avons constaté qu'aucun modèle n'allait jusqu'à la consolidation complète de l'os, c'est-à-dire jusqu'au retrait du fixateur et la mise en marche sans fixateur de l'animal. De ce fait nous avons créé un dispositif d'allongement pour le rat (basé sur son anatomie) et souhaitons venir stimuler la réparation de l'os grâce à l'utilisation d'un biomatériau ou de facteur de croissance qui viendraient exciter et proliférer les cellules permettant la réparation du tissu osseux.

De plus, afin de respecter les règles d'éthique, la règle des "3R sera appliquée". Ainsi, le plus faible nombre d'animaux possible sera inclus. 4 groupes de 20 animaux seront étudiés. 20 avec le substitut osseux pour l'analyse mécanique et microscanner, 20 avec le substitut osseux pour l'analyse biologique, 20 sans substitut osseux pour l'analyse mécanique et microscanner, 20 sans substitut osseux pour l'analyse biologique.

De plus, la douleur et la souffrance seront évaluées lors des protocoles et durant toute la vie de l'animal grâce à une grille d'évaluation de la douleur et nous agirons en conséquence. Pendant la chirurgie, les yeux de l'animal seront protégés de la sécheresse. Durant toute l'opération l'animal est mis sur une couverture chauffante. Enfin, il sera positionné sous une lumière rouge le temps du réveil. Ce protocole est invasif donc pour permettre le bien-être de nos animaux une constante surveillance sera faite tout au long du protocole afin de minimiser les sensations de douleur et d'inconfort. Des grilles de scores nous aideront à modifier notre protocole selon chaque individu. Dans notre protocole nous avons des injections d'analgésique sur une durée de trois jours après la chirurgie. Pendant la suite du protocole cela n'est pas nécessaire sauf si l'animal montre des signes d'inconfort ou de "non bien-être". Les douleurs seront prises en charge grâce à l'ajout d'analgésiant mais seulement pour les scores inférieurs au seuil critique comme la perte de plus 20 % du poids du corps, sinon l'animal devra être euthanasié. Ils auront à disposition nourriture et eau, le cycle jour nuit sera respecté et la température ambiante sera de 22°C. Pour finir une petite balle en plastique pourra être mise dans la cage afin qu'ils puissent se divertir le temps où nous ne sommes pas présents.

9969 Il est bien établi que le bien-être animal passe par une bonne relation entre les animaux et l'éleveur. De nombreux travaux ont donc été développés pour étudier les mécanismes de développement de

la relation, en particulier de diminution de la peur de l'homme inhérente aux conditions de l'élevage industriel. Ils ont montré que des interactions positives (tactiles, associées à la distribution alimentaire, etc.) permettent de diminuer les réactions de peur et de favoriser l'approche de l'homme, ce qui se traduit par un bien-être animal accru et un possible gain de production. Ces travaux ont des limites pratiques évidentes. Ils demandent aux éleveurs de passer beaucoup de temps avec leurs animaux (plusieurs minutes par jour pendant plusieurs semaines) et souvent même d'interagir individuellement avec chacun d'eux. A l'heure où la taille des élevages et des groupes ne cesse d'augmenter, il faut développer des pratiques rapides et efficaces pour diminuer la peur de l'homme. A notre connaissance, le caractère social des porcs et le fait qu'ils passent la plupart de leur carrière en groupe depuis la nouvelle réglementation sur les truies gestantes a peu été pris en compte. Cependant des phénomènes de facilitation sociale existent chez les espèces sociales, et certains comportements vont s'exprimer différemment selon la présence de congénères. La facilitation sociale semble être un mécanisme intéressant pour essayer d'appivoiser des groupes d'animaux. En effet, elle se définit comme le fait que la réalisation d'un comportement par un individu va impliquer sa réalisation par un (ou des) individu(s) observateur(s). Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que la réaction d'un porc à l'homme soit transmissible aux autres animaux du groupe du fait de la facilitation sociale. La facilitation sociale est un phénomène peu étudié chez les porcs mais qui pourrait permettre d'améliorer le bien-être animal tout en optimisant le temps disponible à l'éleveur.

L'objectif de ce projet est d'étudier la transmission de l'approche de l'homme par un animal démonstrateur à des observateurs naïfs, en conditions expérimentales (petits groupes), sur des porcelets sevrés récemment.

Pour cela, nous allons répartir 135 animaux, choisis parmi 180 maximum, en 3 traitements (15 groupes par traitement). Le choix se fera sur la base de la propension des animaux à être attirés par leurs congénères ou pas : la sociabilité, qui sera testée individuellement dans un environnement nouveau pendant 5 minutes. Quatre-vingt-dix animaux très sociaux et 45 non sociaux seront choisis pour la suite. Les animaux seront élevés par groupe de trois, et nous travaillerons uniquement avec des femelles. Quinze groupes seront élevés classiquement sans interventions humaines autres que celles nécessaires à leur élevage. Pour 15 autres groupes, l'un des animaux sera habitué à des contacts humains positifs, à raison de 10 minutes, 2 fois par jour, pendant 2 semaines, puis 10 minutes par semaine. Pour les 15 groupes restant, les trois animaux du groupe seront habitués à des contacts humains positifs à raison de 10 minutes, 2 fois par jour, pendant 2 semaines, puis 10 minutes par semaine. Les animaux seront observés dans leur loge pendant les traitements, ainsi qu'en dehors, afin de déterminer leur niveau d'approche du manipulateur, ainsi que d'évaluer leurs relations sociales. Des tests en paire seront réalisés afin de déterminer l'impact du comportement du démonstrateur sur celui de ces congénères de la même loge. Des tests de comportement individuel d'une durée maximale de 10 minutes seront aussi réalisés afin de mesurer l'attraction pour le manipulateur, ainsi que le caractère social de chaque animal. L'un de ces tests nécessitera l'enregistrement de l'activité cardiaque, et donc l'équipement de chaque animal avec une ceinture élastique dans laquelle nous camouflerons des enregistreurs, ainsi qu'un prélèvement de salive afin de doser le taux de cortisol avant et après la mise en présence du manipulateur.

Nous porterons particulièrement attention au respect des 3R dans ce projet. La notion de remplacement a été réfléchié mais il n'est pas possible à ce jour de modéliser les interactions sociales et la transmission du comportement d'un animal à l'homme, c'est pour cela que nous travaillerons avec des animaux. Le nombre de traitements et d'animaux a été choisi afin d'être réduit au minimum : nous prévoyons des analyses statistiques au niveau des paires ou des groupes, il nous faut donc un minimum de 15 groupes par traitement. La validité statistique sera ainsi assurée, du fait de la variabilité des réponses attendues, même si 1 ou 2 groupes venait à être incomplet. Enfin, le raffinement sera assuré aussi bien pendant l'élevage (présence d'objets à manipuler, suivi régulier de la consommation d'aliment et du comportement) que lors des tests comportementaux qui peuvent induire un stress passager du fait de l'isolement social. Tout au long du projet, les animaux seront suivis quotidiennement au moment des repas par les personnes en charge de l'expérience ou les animaliers formés pour l'expérimentation animale. Tout animal souffrant sera soigné en fonction de son état, selon les recommandations vétérinaires.

9970 Les maladies cardiovasculaires et en particulier l'infarctus du myocarde sont au premier rang de la mortalité mondiale. Notre projet de recherche vise à développer des stratégies cardioprotectrices pour diminuer la taille de l'infarctus et la mortalité.

Outre la réouverture de l'artère occluse la plus précoce possible (appelée reperfusion), il n'y a pas de traitement capable de diminuer la taille de l'infarctus. Ce traitement, bien que totalement indispensable, induit des effets secondaires appelés lésions d'ischémie-reperfusion (IR) qui sont dues au retour brutal du sang et de l'oxygène dans le muscle cardiaque en souffrance et qui entraînent la mort des cellules du muscle cardiaque déjà fragilisées lors de l'infarctus.

L'objectif de notre projet est de réaliser une étude preuve-de concept in vivo chez la souris afin de faire la preuve des effets cardioprotecteurs de peptides brevetés au cours de l'infarctus du myocarde. Pour cela, nous avons développé un modèle chirurgical (ligature de coronaire) et de suivi post-chirurgical (échocardiographie) chez la souris qui reproduit à l'identique la situation clinique chez l'homme. Nous allons tester les peptides en condition réelles d'infarctus in vivo, sélectionner les plus performants et les améliorer pour augmenter leur activité tout en minimisant les doses. Au terme de cette étude, nous pourrions proposer un outil thérapeutique utilisable chez l'homme qui devra être validé par une étude réglementaire préclinique.

Ces peptides sont capables de bloquer la mort cellulaire spécifique des lésions de reperfusion et de diminuer la taille d'infarctus comme l'ont montré nos études préliminaires. Les résultats préliminaires ont montré qu'ils étaient dégradés en 24 heures dans l'organisme et qu'ils étaient dénués de toxicité. Pour l'ensemble du projet, sur 5 ans, nous utiliserons 1486 souris. Cependant, en fonction des résultats obtenus, le nombre de souris à inclure dans notre projet pourra être réduit. Notre étude se fera dans le respect de la règle des 3R :

- Remplacer : les peptides ont déjà été testés in vitro sur divers modèles cellulaires. Uniquement ceux qui n'ont pas de toxicité cellulaire ont été sélectionnés pour l'étude in vivo. Nous ne pouvons pas remplacer ce modèle car l'évaluation des peptides doit maintenant être réalisée dans une véritable étude préclinique permettant de mimer ce qui se passe chez l'homme.

- Réduire : pour une étude sur le long-terme, condition mimant les patients qui survivent, plusieurs mesures seront réalisées et répétées dans le temps afin de récolter le maximum d'informations sur les effets du traitement tout en limitant le nombre d'animaux à inclure. Pour limiter le nombre d'animaux, plusieurs mesures seront faites sur le même animal et des examens seront réalisés en utilisant l'animal comme contrôle interne.

- Raffiner : Nos protocoles ont été optimisés depuis 2012 afin d'améliorer la survie des souris, le suivi clinique le moins invasif possible tout en diminuant la douleur post-opératoire. Ainsi, une liste de points limites (feuille d'observation permettant de quantifier la santé des animaux inclus dans l'étude) a été définie par le concepteur projet et les expérimentateurs.

9971 Une mutation non-sens est une mutation transformant un codon en un arrêt prématuré de la traduction. Nous identifions au laboratoire des molécules permettant de forcer la machinerie traductionnelle à ignorer la présence des codons stop prématurés afin d'induire la synthèse de protéines de taille sauvage avec seulement un acide aminé différent par rapport à la protéine sauvage. Ces molécules représentent de potentielles approches thérapeutiques pour des maladies génétiques causées par des mutations non-sens ce qui représentent environ 10% des patients atteints de maladies génétiques. Nous recherchons des molécules capables de restaurer une expression fonctionnelle de gènes porteurs d'une mutation non-sens. Nous souhaitons donc pouvoir tester nos molécules dans des modèles murins afin de tester l'efficacité de nos molécules in vivo.

Les modèles qui seront utilisés seront des souris immunodéprimées Nude et des souris immunocompétentes Balb/C et C57Bl/6. Pour cette étude de 5 ans, nous planifions d'utiliser 800 souris Nude, 800 souris Balb/C et 800 souris C57Bl/6. Ce projet est en conformité avec les exigences de remplacement puisque l'étude in vivo sur des modèles animaux est indispensable avant le passage éventuel de molécules à visée thérapeutique vers des essais cliniques, de réduction puisqu'une phase exploratoire avec un nombre réduit d'animaux par lot (lot de 5) sera effectuée afin d'identifier la voie d'exposition, la concentration et la cinétique d'action de la molécule étudiée et ce afin d'abaisser au minimum le nombre d'animaux qui seront ensuite utilisés pour la démonstration de l'efficacité d'action de la molécule in vivo. Ce nombre sera de 40 ce qui

correspondra à deux séries d'expériences avec 10 animaux par condition (avec et sans la molécule). La répétition de l'expérience est nécessaire pour s'affranchir d'un éventuel effet biaisé lié à la préparation de la molécule, au lot d'animaux ou à un stress survenu pendant l'expérience. Le nombre de 10 animaux par condition et par série afin de pouvoir réaliser ensuite un "student test" qui est le test statistique utilisé dans les expériences permettant d'évaluer l'efficacité d'un traitement. Enfin, concernant le raffinement, l'expérience sera toujours menée de façon à prévenir ou à réduire au maximum toute souffrance. Ainsi, la voie d'exposition efficace la moins invasive sera privilégiée (le gavage par rapport à la pose d'une pompe osmotique par exemple) et une anesthésie sera effectuée lorsque cela est compatible avec l'expérience.

9972 Le mélanome est une tumeur maligne agressive qui se développe à partir de cellules de la peau : les mélanocytes. Notre laboratoire s'intéresse à un type particulier de ces tumeurs de la peau qui représente 70% des mélanomes. Dans 60% des cas, l'origine de ces cancers provient d'une mutation d'un gène identifié (BRAF). Cette mutation conduit à une prolifération anarchique et à l'invasion cellulaire. Chaque année, 233 000 personnes sont atteintes de mélanome dans le monde et 55 000 d'entre elles en meurent. Des thérapies ciblées existent pour ces mélanomes. Cependant un des problèmes majeurs est la résistance des cellules tumorales à ces thérapies. L'objectif de notre projet est de tester des thérapies et des molécules pouvant lever la résistance à ces traitements. Nous avons pour cela deux cibles moléculaires clairement identifiées in vitro. Ces deux protéines cibles sont surexprimées dans des cellules de patients résistants à la thérapie utilisée actuellement. Nous avons démontré que ces cibles étaient nécessaires à la prolifération tumorale des lignées résistantes dans différents modèles de culture en 2D et en 3D. Actuellement il n'existe pas de modèle alternatif qui puisse reproduire la complexité de l'organisme pour la progression tumorale et au niveau des interactions moléculaires : thérapies et protéines cibles.

Si nos résultats se confirment en expérimentation in vivo, ces protéines pourraient constituer une cible potentielle dans la résistance au traitement, en vue d'une application clinique chez l'homme. Nous allons réaliser des xénogreffes sous-cutanées, chez la souris NSG (NOD scid gamma mice), de lignées de mélanome humain sensibles ou résistantes aux traitements utilisés en clinique sur des animaux qui 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, mais aussi en mettant tout en œuvre afin de veiller au bien-être animal. Tout problème concernant l'état de santé des animaux sera communiqué, 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 sera mise en place, par les responsables du projet, pour chaque procédure. Nous demandons pour réaliser l'ensemble de nos expériences 160 animaux et afin de restreindre le nombre d'animaux, nous combinerons nos lots témoins.

9973 En France l'arthrose touche plus de 10 millions de patients, avec un impact socio-économique majeur. Malheureusement cette pathologie ne dispose pas d'un arsenal thérapeutique suffisamment efficace. Les différences entre le placebo et les nombreuses thérapies utilisées sont généralement assez modestes.

Le défi majeur actuel concernant l'arthrose est de découvrir et de développer des médicaments capables d'agir sur les phénomènes à l'origine de l'atteinte articulaire, et n'agissant pas seulement sur les symptômes. Un autre objectif important est de comprendre le manque actuel de corrélation entre l'aspect des lésions vues en imagerie et la gêne fonctionnelle subie par le patient.

L'arthrose est la résultante de phénomènes mécaniques et biologiques qui déstabilisent l'équilibre entre la synthèse et la dégradation du cartilage. Ce déséquilibre peut être initié par de multiples facteurs : génétique, métabolique, ou traumatique. Le chondrocyte est l'unique type cellulaire présent dans le cartilage articulaire. Il est capable de synthétiser mais également de dégrader le cartilage. En cas de stress mécanique anormal, les chondrocytes augmentent la sécrétion de protéines inflammatoires, et la production de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS).

Le projet a pour but de moduler la quantité de ROS produite dans trois modèles d'arthrose différents et d'évaluer l'effet sur le développement de la maladie. L'objectif secondaire de cette étude est de

corrélér la gène fonctionnelle des animaux avec des techniques d'imagerie innovantes : IRM, et une nouvelle technique à rayon X encore plus performante et actuellement en cours de mise au point.

Remplacer

Nos résultats in vitro ont identifié une enzyme comme la principale source de ROS dans les chondrocytes humains. La modulation de son activité pourrait par conséquent être un outil thérapeutique prometteur dans l'arthrose. Il reste à prouver cette hypothèse in vivo. Le choix de la souris s'impose car il existe des souris mutées pour cette enzyme.

Réduire

Un calcul statistique sur les effets attendus de l'inhibiteur de l'enzyme visée, ainsi que des publications sur ce modèle d'arthrose nous amènent à un effectif de 212 souris.

Raffiner

L'évolution de la maladie se fera sur 8 à 12 semaines. Ce délai est suffisamment long pour que des lésions histologiques soient observées mais suffisamment court pour que les animaux ne soient pas trop handicapés par le début de la gène fonctionnelle. Cette gène fonctionnelle sera évaluée chaque semaine et les animaux euthanasiés si elle devient trop importante. Un index basé sur plusieurs critères sera calculé avec un score limite entraînant l'euthanasie.

La contrainte maximale est de grade modérée.

9974 La maladie de Pompe (glycogénose de type II) est une maladie génétique due à un déficit en alpha-glucosidase acide (GAA). La GAA étant la seule enzyme responsable de la dégradation du glycogène en glucose dans les lysosomes, il en résulte une surcharge en glycogène dans les tissus, qui est particulièrement importante dans les muscles squelettiques. Cliniquement, il existe deux formes de la maladie. La forme infantile est la plus sévère, avec une atteinte du cœur conduisant au décès avant l'âge de 2 ans. La forme adulte est plus progressive. Tous les patients atteints de la maladie de Pompe ont en commun l'atteinte des muscles squelettiques, se traduisant par une faiblesse musculaire et des difficultés respiratoires.

L'administration intraveineuse à vie de l'enzyme recombinante GAA permet de corriger la cardiomyopathie et d'augmenter l'espérance de vie des patients atteints de la forme infantile. Cependant, ce traitement n'est que partiellement efficace sur les muscles squelettiques, malgré des doses élevées. Il est lourd et contraignant, nécessitant une administration de plusieurs heures toutes les deux semaines d'un coût très élevé (~500 000 euros/patient/an).

De nouvelles stratégies thérapeutiques sont aujourd'hui testées en clinique. La première vise à utiliser une enzyme optimisée chimiquement. La seconde vise à apporter la GAA par thérapie génique dans le diaphragme ou dans le muscle squelettique. De plus, d'autres stratégies sont en cours de développement, dont la thérapie génique ciblant le foie, de manière à diminuer la réponse immunitaire et sécréter davantage la GAA par le foie, ou encore la thérapie cellulaire par la transplantation de cellules souches hématopoïétiques.

La physiopathologie musculaire n'est aujourd'hui encore pas totalement connue. Toutefois, deux phénomènes majeurs sont largement décrits. Il s'agit d'une part de l'augmentation en taille et en nombre des lysosomes surchargés en glycogène, et d'autre part de la dérégulation des flux autophagiques se traduisant par l'accumulation de débris autophagiques dans les fibres musculaires, non éliminés par les lysosomes dysfonctionnels. Au niveau tissulaire, ces deux événements se traduisent par une vacuolisation progressive des fibres musculaires. La perturbation de l'homéostasie du calcium ainsi que des anomalies mitochondriales sont également rapportés. Une étude a démontré un déficit de régénération musculaire sur des biopsies de patients, dû à un défaut d'activation des cellules satellites qui sont responsables des phénomènes de croissance et de réparation des fibres musculaires. Le pool de cellules satellites étant préservé chez les patients, une nouvelle stratégie thérapeutique à envisager pourrait être le développement d'un traitement permettant l'activation des cellules satellites endogènes et ainsi la régénération musculaire.

Toutefois, ce défaut d'activation des cellules satellites chez les patients atteints de la maladie de Pompe reste inexplicé. Devant l'importance de la pathologie musculaire évoquée précédemment (accumulation de lysosomes surchargés en glycogène et de débris autophagiques conduisant à la perturbation de l'organisation des myofibrilles et à la vacuolisation des fibres musculaires) une réponse des cellules satellites permettant la régénération des fibres endommagées serait attendue.

L'absence d'activation de ces dernières pourrait s'expliquer de deux manières : soit par un dysfonctionnement de ces cellules, soit par l'absence ou l'insuffisance de signal activateur. Notre présente étude vise à analyser en détail la fonctionnalité des cellules satellites dans le contexte de la maladie de Pompe. La finalité de cette démarche sera d'améliorer l'état des connaissances autour de la composante musculaire et en particulier des cellules satellites dans la maladie de Pompe et ainsi améliorer à la fois les stratégies thérapeutiques et les outils d'évaluation de ces stratégies.

Le dessin expérimental respectera le principe des 3R :

- Remplacement : l'utilisation d'un modèle murin présentant les caractéristiques de la maladie est le modèle le plus pertinent pour étudier la physiopathologie musculaire. Les animaux utilisés seront des souris GAA-KO et des souris WT (utilisées comme contrôle). Au total, 182 animaux seront inclus dans le projet.

- Réduction : des groupes de 4 à 5 animaux seront constitués pour les expérimentations, ce qui représente un nombre nécessaire pour constituer des groupes analysables statistiquement.

- Raffinement : 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. Ces critères concerneront l'apparence générale des animaux, leur poids, les signes cliniques apparents ainsi que leur comportement. En fonction du score obtenu lors du suivi hebdomadaire, des dispositions adaptées seront prises.

9975 Les cônes sont des mollusques prédateurs marins qui utilisent un venin neurotoxique pour capturer leur proie. Certaines espèces de cônes se nourrissent de poissons et sont capables d'infliger des piqûres fatales aux humains. De même, certaines araignées telles que la Dolomède ou l'argyronète s'attaquent aux poissons. Les venins de ces deux types d'animaux venimeux représentent une source exceptionnelle de nouvelles biomolécules d'intérêt thérapeutique (par exemple, médicament contre la douleur chronique tel que le Prialt).

Pour comprendre ces effets, des études pharmacologiques ont été réalisées principalement sur des modèles mammifères (souris, rat). Or, les toxines de cônes et d'araignées piscivores ont évolué pour cibler de façon spécifique les récepteurs de leur proie. Nous proposons donc dans ce projet d'utiliser le modèle poisson zèbre pour déterminer l'activité biologique des venins et toxines de cônes et d'araignées dans le but de caractériser de nouveaux outils pharmacologiques et molécules d'intérêt thérapeutique. Pour ce faire, nous proposons de tester dans un premier temps 10 venins (7 venins issus de cônes et 3 issus d'araignées) sur le comportement de poissons-zèbres à l'état larvaire et adulte. Les venins induisant un effet sur ces comportements seront ensuite traités en laboratoire pour en extraire et en purifier les toxines. Nous espérons isoler 4 toxines d'intérêts et en quantité suffisante par venin, soit au maximum 40 toxines si tous les venins ont montré un effet sur le comportement des poissons.

Cette démarche nécessite au maximum l'utilisation de 1500 larves de poissons-zèbres et de 1500 adultes et s'inscrit en conformité de la règle des "3R".

Du point de vue du Remplacement, les poissons sont les proies naturelles de nombreux cônes et de certaines araignées. Il convient donc de tester les effets de leur venin sur un modèle approprié. De plus, étant donné les ressemblances physiologiques significatives entre les poissons et les mammifères, les effets constatés chez le poisson zèbre seront une estimation acceptable des effets potentiels sur l'homme.

Du point de vue de la Réduction, nous utilisons des tests statistiques permettant de maximiser l'utilisation des animaux en élevage et de ne pas sacrifier inutilement des animaux générés dans l'animalerie. Le nombre d'animaux estimé dans ce protocole est proportionnel au nombre de toxines testées et est suffisant pour justifier d'une pertinence scientifique. De plus, l'utilisation indifférenciée de mâles et de femelles permet également de réduire le nombre d'animaux. Enfin, seuls les venins induisant un effet sur le comportement des poissons seront utilisés pour les étapes suivantes, c'est-à-dire la purification des toxines et l'étude de leurs effets sur le comportement du poisson. Par

conséquent, nous ajusterons le nombre d'animaux à la baisse si seuls quelques-uns des venins testés montrent un effet au cours de la première phase d'expérimentation.

Du point de vue du Raffinement, l'utilisation des larves permet d'étudier le comportement de celles-ci en les incubant directement dans un milieu contenant les toxines d'intérêt (méthode non invasive). Pour les adultes, une grille d'évaluation sera mise en place afin d'évaluer la toxicité des substances utilisées et de suivre le bien-être de nos animaux. Nous prêterons une attention toute particulière aux comportements de nage, taux de ventilation et prise d'aliments.

9976 Une mutation non-sens est une mutation transformant un codon en un arrêt prématuré de la traduction. Nous identifions au laboratoire des molécules permettant de forcer la machinerie traductionnelle à ignorer la présence des codons stop prématurés afin d'induire la synthèse de protéines de taille sauvage avec seulement un acide aminé différent par rapport à la protéine sauvage. Ces molécules représentent de potentielles approches thérapeutiques pour des maladies génétiques causées par des mutations non-sens ce qui représentent environ 10% des patients atteints de maladies génétiques. Nous recherchons des molécules capables de restaurer une expression fonctionnelle de gènes porteurs d'une mutation non-sens. Nous souhaitons donc pouvoir tester nos molécules dans un modèle murin mucoviscidose afin de tester l'efficacité de nos molécules in vivo dans le cadre d'une maladie rare.

Ce modèle murin a donc été créé. Ces souris nommées CFTR-NS sont porteuses d'une mutation non-sens dans le gène codant le canal CFTR responsable de la mucoviscidose lorsqu'il est défaillant. Pour cette étude de 5 ans, nous planifions d'utiliser 1100 souris CFTR-NS. Ce projet est en conformité avec les exigences de remplacement puisque l'étude in vivo sur des modèles animaux sont indispensables avant le passage éventuel de molécules à visée thérapeutique vers des essais cliniques, de réduction puisqu'une phase exploratoire avec un nombre réduit d'animaux par lot (lot de 5) sera effectuée afin d'identifier la voie d'exposition, la concentration et la cinétique d'action de la molécule étudiée et ce afin d'abaisser au minimum le nombre d'animaux qui seront ensuite utilisés pour la démonstration de l'efficacité d'action de la molécule in vivo. Ce nombre sera de 40 ce qui correspondra à deux séries d'expériences avec 10 animaux par condition (avec et sans la molécule). La répétition de l'expérience est nécessaire pour s'affranchir d'un éventuel effet biaisé lié à la préparation de la molécule, au lot d'animaux ou à un stress survenu pendant l'expérience. Le nombre de 10 animaux par condition et par série afin de pouvoir réaliser ensuite un "student test" qui est le test utilisé dans les expériences permettant d'évaluer l'efficacité d'un traitement. Enfin, concernant le raffinement, l'expérience sera toujours menée de façon à prévenir ou à réduire au maximum toute souffrance. Ainsi, la voie d'exposition efficace la moins invasive sera privilégiée (le gavage par rapport à la pose d'une pompe osmotique par exemple).

9977 La drépanocytose est une maladie héréditaire affectant les globules rouges. Les patients souffrent de crises douloureuses à la suite de l'obstruction de vaisseaux sanguins. Le fonctionnement des vaisseaux est également perturbé, aboutissant à des complications vasculaires. La pathologie rend aussi les globules rouges fragiles menant les patients à une anémie chronique. Récemment, un processus appelé éryptose ou mort par suicide du globule rouge a été suggéré comme pouvant participer à ces anomalies. Celui-ci pourrait être accru en cas d'un stress oxydant ou d'une inflammation exacerbée, phénomènes majeurs chez les patients drépanocytaires. L'éryptose s'accompagne de l'émission de petites vésicules du globule rouge appelées microparticules (MPs). Ces éléments pourraient avoir des effets néfastes sur les vaisseaux et la coagulation. Pour autant, le rôle de ces processus et les mécanismes associés conduisant aux perturbations observées sont méconnus.

Par ailleurs, l'activité physique est reconnue chez l'individu sain mais également atteint de maladies cardiovasculaires comme pouvant limiter l'inflammation et le stress oxydant et donc potentiellement endiguer l'éryptose, réduisant les conséquences cliniques de ces altérations.

L'objectif de ce projet est de déterminer le rôle de l'éryptose et des MPs érythrocytaires dans les anomalies vasculaires, l'anémie chronique et les déséquilibres de la balance thrombose/hémostase rencontrés dans la drépanocytose. L'étude permettra en outre de mettre en évidence le rôle

potentiellement bénéfique de l'activité physique en tant que contre-mesure face aux mécanismes aboutissant à la mort des globules rouges et à l'émission de ces MPs.

Des modèles murins transgéniques drépanocytaires seront injectés avec des MPs érythrocytaires isolées chez le patient et l'individu sain et les répercussions de ces MPs sur les fonctions vasculaires in vivo et ex vivo seront analysées. En outre, des souris drépanocytaires réaliseront un protocole d'entraînement volontaire et les conséquences de celui-ci sur le phénomène d'eryptose, la libération de MPs érythrocytaires, la fonction vasculaire des animaux et la formation des caillots sanguins seront étudiées.

Les résultats issus de ces protocoles permettront de développer les connaissances scientifiques sur la physiopathologie de la maladie et pourront ainsi potentiellement mener à l'élaboration de traitements visant à limiter les complications vasculaires, l'anémie et les troubles de la coagulation. 436 souris seront incluses dans ce projet. La règle des 3R a été appliquée. La drépanocytose étant une maladie systémique multi-organes et l'objectif principal de l'étude étant de mesurer le fonctionnement des vaisseaux et d'évaluer des marqueurs sanguins, une approche intégrée est donc indispensable. Aucune méthode alternative ne peut donc se substituer à l'utilisation des animaux pour la réalisation de notre projet. Le nombre de souris nécessaire à nos travaux a été réduit au minimum sans compromettre l'interprétation statistique de nos résultats. Le « Raffinement » a été optimisé : les souris n'exprimant que de l'hémoglobine humaine, elles modélisent finement et fidèlement la maladie présente chez les patients. Les souris seront suivies avec un soin particulier et des points limites sont clairement définis, afin de détecter précocement tout signe de souffrance.

9978 Le projet vise à étudier le rôle des basophiles dans le développement de pathologies auto-immunes humaines, notamment la néphrite lupique, n'ayant pas d'approche thérapeutique spécifique et efficace.

Le lupus est une maladie auto-immune systémique multifactorielle touchant, en France, environ une personne sur 2000, principalement des femmes (9/10) en âge d'enfanter. Cette maladie est caractérisée par le développement d'anticorps reconnaissant le soi (autoanticorps) qui vont former des complexes immuns circulants (CIC). Ces CIC vont se déposer dans les organes cibles, y entraînant une inflammation chronique pouvant mener à une perte de fonction. Cette maladie évolue par poussées et peut affecter différents organes (peau, articulations, tissus conjonctifs et rein). L'affection rénale est appelée néphrite lupique (NL) et peut mener à une insuffisance rénale terminale nécessitant une transplantation. Sans approche thérapeutique spécifique, les patients sont traités par de fortes doses de corticostéroïdes et d'immunosuppresseurs, avec les effets secondaires délétères de ces traitements. Développer des approches thérapeutiques spécifiques et efficaces est un enjeu majeur pour une meilleure prise en charge de ces patients.

Les basophiles sont connus pour leur implication dans les allergies et également dans le développement de pathologies inflammatoires et auto-immunes. Nous avons montré que les basophiles amplifiaient la maladie lupique tant dans des modèles murins que chez des patients lupiques. Les mécanismes précis de cette amplification ne sont pas identifiés et leur compréhension permettra de valider des cibles thérapeutiques spécifiques prévenant les poussées de la maladie chez les patients et ainsi empêchant le développement de la NL. Notre projet vise à étudier ces mécanismes et à tester des cibles influant sur l'activité et la localisation des basophiles comme approche thérapeutique et/ou préventive principalement dans le lupus et la NL. Le projet développera des outils et des essais précliniques afin de valider la pertinence des approches identifiées. D'autres pathologies auto-immunes présentent certaines caractéristiques communes au lupus (connectivites mixtes et allergies) et seront également étudiées pour vérifier si les approches identifiées pour le lupus peuvent être étendues à d'autres pathologies où les basophiles interviennent.

De par la complexité des maladies étudiées, il n'existe aucune alternative à l'utilisation de modèles animaux développant eux-mêmes la maladie. Ces animaux permettront de valider les nouvelles cibles thérapeutiques identifiées afin de transférer nos découvertes aux patients atteints de lupus.

Les études sur les pathologies humaines décrites ci-dessus disposent toutes de modèles chez la souris, soit des modèles génétiques (Lupus : souris Lyn-/-), soit des modèles induits (Lupus : pristane, connectivite mixte : U1-snRNP, allergies : ovalbumine).

Les modèles allergiques et auto-immunes nécessitent l'application cutanée, l'injection intrapéritonéale, sous-cutanée, et/ou intraveineuse ou encore l'administration orale de substances pharmacologiques et/ou biologiques aux animaux. Les essais précliniques nécessiteront l'administration de substances pharmacologiques et/ou biologiques afin d'évaluer leurs potentiels thérapeutiques.

Des modèles murins ayant des modifications génétiques impactant le nombre et/ou la couleur des basophiles et/ou des mastocytes ainsi que la production de certains facteurs par ces compartiments cellulaires seront utilisés et croisés avec les modèles spontanés des pathologies.

Réduction du nombre d'animaux et remplacement des modèles animaux : Le remplacement dans nos études de l'approche par modèle animaux n'est pas possible pour l'étude des mécanismes des maladies complexes comme le lupus ou les immunopathologies rénales en général. Cependant, l'étude de cellules humaines ex vivo et l'analyse des échantillons de patients permet de réduire les hypothèses de travail et ainsi de limiter le recours aux modèles animaux.

Notre projet aura une durée de 5 ans et utilisera un maximum de 650 animaux. Ce nombre est un nombre maximal. Le but des protocoles murins est de pouvoir conclure sur la validité d'une approche thérapeutique pour la pathologie humaine. Sur un plan statistique, afin de pouvoir conclure, 5 animaux par groupe expérimental/contrôle sont utilisés. Si, et seulement si, une tendance justifiant d'être confirmée sur un nombre plus important d'individus est constatée, alors le nombre d'animaux par groupe pourra être amené à 10 maximum. Si la significativité statistique est atteinte, nous ne serons pas amenés à augmenter ce nombre.

Raffinement de la méthodologie utilisée : ne sont testés dans les modèles murins que les cibles identifiées au préalable dans des échantillons sanguins humains. Il n'existe pas de lignées cellulaires de basophiles matures, ni de méthode de culture à long terme in vitro, ce qui nécessite d'utiliser des cellules primaires de souris.

Des organes (ganglions, rate et moelle osseuse) seront prélevés afin d'établir des cultures primaires de cellules. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, des expériences seront regroupées sur de mêmes individus (une souris contrôle d'une expérience in vivo verra ses organes utilisés pour des cultures cellulaires et des expériences in vitro).

Les procédures d'administration et de traitement des souris seront détaillées dans le présent projet. Les interventions sur les animaux vivants se limiteront aux prélèvements sanguins sur animaux anesthésiés à l'isoflurane (inférieurs à 100 ul et espacés d'au moins deux semaines), à la collecte d'urines et de tissus pour le génotypage, et enfin les injections décrites ci-dessus.

Aucun traitement induisant la mort ou une souffrance soutenue de l'animal n'est prévu dans le présent projet. Les animaux seront euthanasiés par inhalation de CO₂ avant prélèvements des organes à analyser. En cas de souffrance/mal-être manifeste de l'animal (inactivité, prostration, déplacement difficile, etc.) ce dernier sera euthanasié immédiatement. Seule la procédure d'injection de pristane aux souris de fond génétique Balb/c peut induire (20%) une souffrance manifeste des animaux par formation d'ascite (plasmacytome péritonéal). Dans ce cas précis, si la formation d'une ascite est constatée, les animaux concernés seront euthanasiés.

9979 La fibrose pulmonaire se caractérise des dépôts excessifs de matrice extracellulaire et de fibroblastes, conduisant à une réduction de l'élasticité pulmonaire et à une destruction des alvéoles pulmonaires mortelle. Un défaut de réparation de l'épithélium respiratoire dû à l'altération des interactions entre les cellules épithéliales alvéolaires et les fibroblastes sous-jacents entraîne un remodelage de l'épithélium respiratoire et à l'initiation d'un processus fibrosant. Les traitements actuels de la fibrose pulmonaire ne font que ralentir la progression de la maladie. Avec une médiane de survie accrue chez ces patients, on peut craindre l'apparition de cancer du poumon. En effet, les patients atteints de fibrose pulmonaire sont plus susceptibles de développer des cancers du poumon.

Avec l'émergence de ces nouveaux traitements prometteurs, il est donc crucial de mieux comprendre la physiopathologie de ces cancers menaçant potentiellement les patients atteints de

fibrose pulmonaire. Les mécanismes conduisant à l'apparition du cancer chez les patients FPI sont encore mal connus. Nous proposons que la fibrose elle-même favoriserait l'apparition des cancers du poumon chez ces patients. Nos travaux de recherche permettront d'identifier le rôle de la fibrose sur le développement des tumeurs épithéliales pulmonaires. Ainsi, une meilleure connaissance de la physiopathologie de ces cancers chez les patients FPI est nécessaire pour développer de nouvelles thérapies ciblées et une meilleure gestion de ces patients fragiles.

A ce jour, il n'existe pas de méthodes alternatives à l'utilisation de souris pour modéliser le développement du cancer pulmonaire dans le contexte de la fibrose pulmonaire. Le nombre d'animaux utilisé sera celui nécessaire afin d'atteindre les objectifs du projet. La pathologie humaine de la fibrose pulmonaire affectant les adultes nous utiliserons des souris de 8 à 12 semaines. En particulier, nous utiliserons le modèle de fibrose induite par l'instillation intratrachéale de FITC (abord chirurgical; la douleur sera prise en charge par une analgésie adaptée). En respectant les exigences de remplacement (utilisation de la culture primaire de cellules épithéliales alvéolaires et les fibroblastes pulmonaires), de réduction (calcul du nombre minimum d'animaux à utiliser pour pouvoir réaliser des analyses statistiques et de raffinement (utilisation des prélèvements animaux pour plusieurs types d'analyses) (3Rs) nous avons calculé que le nombre d'animaux nécessaires à cette étude serait d'un total de 480 souris pour l'ensemble des expériences (nombre estimé par un calcul de puissance sur la base de travaux préliminaires). En plus d'un suivi quotidien et attentif, nous avons également défini des points limites stricts afin de privilégier et respecter le bien-être des animaux impliqués dans ce protocole. Différents points limites ainsi associés à la masse tumorale et/ou la fibrose pulmonaire seront considérés dans ce protocole : 1) détresse respiratoire en particulier, souffrance et/ou détresse en général; 2) impact significatif sur les fonctions normales du corps (motricité, etc.); 3) perte de poids dépassant 20 % du poids du corps d'un animal normal semblable et 3) trauma auto-induit persistant. Ainsi, l'observation d'un seul de ces points limites conduira à la sortie immédiate de l'animal du protocole et à son euthanasie.

9980 De nombreux types de mémoire (mémoire spatiale, mémoire de travail et mémoire émotionnelle) dépendent de la communication entre régions du cerveau au sein de réseaux clés. Le présent projet a pour but d'étudier les réseaux cérébraux qui sont modulés par la voie cortex préfrontal-habénula latérale, lors de l'élaboration de ces différents types de mémoire en enregistrant l'activité électrique de structures d'intérêt et ainsi rendre compte de leur degré de communication, et en étudiant l'impact de l'inactivation sélective (technique pharmacogénétique) de cette voie sur ces communications. Pour cela, sous anesthésie générale, les constructions virales permettant l'inactivation ultérieure de cette voie (chez l'animal vigile) seront micro injectées dans le cortex préfrontal et l'habénula latérale ; des électrodes d'enregistrement seront implantées dans ces deux structures ainsi que dans l'hippocampe et l'aire tegmentale ventrale, afin de pouvoir étudier l'activité de ce réseau pendant une tâche comportementale ciblant l'un des types de mémoire à l'étude.

Ce projet nécessitera l'utilisation de 180 rats.

Règle des 3R. 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 les processus mnésiques, il n'est pas possible de recourir à d'autres modèles. 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. 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 avec un minimum de stress ; 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); les rats seront hébergés par deux avant la chirurgie et individuellement après la chirurgie.

9981 Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) sont les seules cellules souches de l'adulte ayant une utilisation thérapeutique prouvée notamment au cours de la greffe de moelle osseuse. Au niveau de la moelle osseuse, les CSH sont maintenues hors du cycle cellulaire dans un état non prolifératif de repos appelé « quiescence » au sein de structures anatomiques spécialisées

appelées « niches hématopoïétiques ». Les CSH sont non seulement responsables de la génération de toutes les cellules sanguines mais elles sont également capables de se maintenir tout au long de la vie d'un individu. Cette propriété fondamentale appelée « auto-renouvellement » est une fonction tellement essentielle qu'elle est visée par la plupart des événements génétiques et/ou épigénétiques transformants qui conduisent aux hémopathies malignes. De manière analogue aux CSH, il a été suggéré que les cellules souches cancéreuses (CSC) sont à l'origine de la plupart de ces hémopathies et capables de générer toutes les cellules tumorales. De ce fait, les CSC et les CSH possèdent de nombreuses propriétés communes notamment la capacité d'auto-renouvellement, de prolifération/survie et de différenciation. Les CSC peuvent également se mettre en quiescence afin d'échapper à l'action des molécules thérapeutiques comme la chimiothérapie. Bien que les mécanismes précis qui contrôlent l'entrée et la sortie des cellules souches hors de quiescence restent mal connus, des données suggèrent qu'ils seraient le fondement de l'échappement des CSC aux thérapies et des rechutes après traitement. C'est pourquoi notre équipe de recherche a pour but la caractérisation et l'étude des voies de signalisations impliquées dans le maintien en quiescence des cellules souches hématopoïétiques normales et leucémiques. Parmi ces voies, nous avons identifié les gènes de l'horloge circadienne, qui synchronise les fonctions biologiques internes de l'organisme avec notre environnement, comme acteurs potentiels majeurs, et souhaitons valider cette hypothèse à l'aide d'expériences in vivo. Le développement tumoral faisant intervenir une cascade d'évènements cellulaires et moléculaires spécifiques à chaque cancer, il est impossible de les récapituler dans leur intégralité in vitro ou in silico. De plus, les CSC représentent une population très rare, difficile à isoler et à étudier à partir de prélèvements frais de patients du fait de l'absence de marqueurs spécifiques. Pour toutes ces raisons, le recours aux modèles animaux est incontournable afin de répondre à ces interrogations et envisager de nouvelles cibles thérapeutiques en cancérologie. Nous proposons de répondre à la question du rôle des gènes de l'horloge circadienne dans le maintien des cellules souches normales et leucémiques par une approche expérimentale globale faisant intervenir des études in cellulo et in vivo. Cette dernière sera réalisée non seulement à l'aide de modèles murins invalidés préétablis pour certains gènes de l'horloge mais également par la création d'un nouveau modèle de souris transgénique permettant l'expression inductible de l'oncogène responsable de la Leucémie Myéloïde Chronique (LMC) chez l'homme. Ce nouveau modèle de LMC possède plusieurs avantages par rapport aux technologies existantes : i) la réduction considérable du nombre d'animaux expérimentaux car l'induction et le développement de la LMC s'observe au sein du même animal ; ii) la reproductibilité de notre modèle est directement liée au mode « inductible » du système, ce qui contribue également à réduire les erreurs et ainsi le nombre d'animaux expérimentaux ; iii) la méthode inductible signifie également que le phénotype est réversible, ce qui permet de limiter considérablement l'angoisse et la douleur des animaux à tout moment. Par ailleurs, afin de prévenir, d'atténuer ou soulager la douleur et l'angoisse pendant les procédures expérimentales nous userons de points limites éthiques, de l'anesthésie et de l'analgésie respectivement. En conclusion, ces travaux qui ont été rigoureusement conçus en suivant les principes éthiques de la directive européenne et des 3R, nécessiteront au total 590 souris. Ils vont nous permettre non seulement d'accroître nos connaissances fondamentales sur les mécanismes de la régulation des cellules souches normales et cancéreuses mais également à terme d'élaborer des thérapies innovantes plus efficaces contre la LMC et d'autres cancers qui font intervenir une population résistante de cellules souches cancéreuses quiescentes.

9982 L'immunothérapie anti-cancéreuse a permis l'amélioration du traitement de nombreux cancers et constitue un domaine de recherche en plein essor. Parmi les immunothérapies, la vaccination thérapeutique offre un véritable potentiel contre la plupart des cancers qui est attesté par les nombreux essais vaccinaux actuellement en phase préclinique et clinique. Pour être efficace, les vaccins thérapeutiques doivent générer une immunité anti-tumorale forte alors que l'environnement tumoral est pour sa part fortement immunosuppresseur. Il est donc crucial de produire des vaccins capables de déclencher des réponses immunitaires intenses contre des antigènes tumoraux. Notre groupe a pour objectif de développer de tels vaccins contre différents cancers.

Pour évaluer l'efficacité vaccinale, les techniques de culture cellulaires réalisées in vitro ne sont pas adaptées car les mécanismes de défense immunitaire sont le fruit d'interactions complexes entre de multiples partenaires cellulaires présents dans différents tissus et qui doivent migrer jusqu'aux sites tumoraux. Il en résulte que l'efficacité d'un vaccin doit être évaluée chez l'animal de laboratoire sur la base de sa capacité à déclencher une réponse immunitaire capable de contrôler la croissance de différentes tumeurs. Dans le cadre de ce projet, nous nous proposons donc de réaliser les études d'efficacité préclinique des différents vaccins produits au laboratoire. Ces travaux précliniques seront menés contre le glioblastome et le cancer du côlon en utilisant des rongeurs. Comme les mécanismes de croissance tumorale, d'immunosuppression et de contrôle tumoral peuvent différer sensiblement entre différents types de cancer il n'est pas possible d'évaluer l'efficacité d'un vaccin contre plusieurs cancers à la fois chez le même animal. Les études de protection vaccinale vis-à-vis de chaque cancer seront donc effectuées de façon séparée. Il en résulte que 1760 rongeurs au maximum seront requis afin d'évaluer l'efficacité vaccinale contre deux modèles de cancers.

Dans le cadre de ce projet les animaux seront nés et élevés en captivité dans des élevages agréés. Nous serons attentifs à la règle des 3R afin de n'utiliser que le nombre minimum d'animaux nécessaire pour assurer la validité des expériences. Les cellules tumorales et vaccins seront injectés à des animaux qui auront été préalablement anesthésiés. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et évalué afin d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance. Les biopsies requises pour analyser la tumeur seront réalisées après euthanasie des animaux. L'application de critères d'arrêt et le suivi régulier des animaux hébergés en groupe permettront de garantir le bien-être des animaux.

9983 Ces travaux pratiques s'inscrivent dans le cadre de la formation à la chirurgie pour l'expérimentation animale. Plus particulièrement, ce TP permettra aux stagiaires d'une part, de se former aux différentes étapes de chirurgie cardiaque depuis l'anesthésie et l'intubation de l'animal jusqu'au prélèvement du cœur pour analyse. Le protocole de chirurgie cardiaque sera celui de l'infarctus reperfusé, constituant une maladie cardiovasculaire au premier plan de la mortalité liée à la souffrance ischémique et la survenue d'arythmies.

L'objectif pédagogique de ces travaux pratiques présentés sous forme d'une vidéo est de former les stagiaires aux bonnes pratiques qu'il faut maîtriser en chirurgie cardiaque pour travailler sur le modèle murin, modèle largement utilisé aujourd'hui du fait de la multiplicité des lignées transgéniques. Le protocole étudié est celui de l'infarctus reperfusé chez la souris. L'intérêt pédagogique de ce type de protocole dans le cadre de la formation chirurgie est de montrer les étapes de microchirurgie qui permettent d'obtenir un modèle d'étude de la pathologie cardiaque.

L'infarctus du myocarde constitue la première cause de mortalité cardiovasculaire. Il survient le plus souvent par l'obstruction brutale d'une artère coronaire suite à la rupture d'une plaque d'athérome et la formation d'un caillot au site de la lésion. Le seul traitement qui est recommandé est la réouverture de l'artère occluse soit par injection de médicaments détruisant le caillot sanguin, soit mécaniquement au cours d'une procédure où le cardiologue vient aspirer le caillot et dilater la paroi du vaisseau. Cependant, cette reperfusion du myocarde s'accompagne d'effets délétères secondaires appelés lésions de reperfusion induisant la mort des cardiomyocytes. D'autre part, la phase critique post-infarctus s'accompagne de survenue d'arythmies qui peuvent engendrer la mort du patient. Il est donc important de disposer d'un modèle d'étude de l'infarctus chez le mammifère qui soit le plus proche de celui de l'homme, où il est possible d'induire l'infarctus et d'étudier l'évolution du rythme cardiaque à l'aide de l'électrocardiogramme.

Pour ce faire, nous avons développé un modèle chirurgical d'ischémie-reperfusion myocardique chez la souris qui mime le cas des patients présentant un infarctus suite à une occlusion coronaire et pour lequel une revascularisation est réalisée, générant ainsi des lésions de reperfusion in vivo. L'ischémie est provoquée par une ligature réversible de la coronaire gauche à l'aide d'un fil de chirurgie passé autour du lit vasculaire de la coronaire qui va produire un arrêt de perfusion de l'artère et donc du territoire normalement irrigué.

Les participants pourront visionner le film comportant toutes les phases du protocole : préopératoire, peropératoire et postopératoire.

L'expérimentation proposée aux participants (enregistrement de l'électrocardiogramme par télémétrie) a pour but l'enseignement des bonnes pratiques d'expérimentation chez l'animal, en particulier l'utilisation du système d'acquisition par télémétrie de l'électrocardiogramme et ce, dans le cadre d'une formation réglementaire à la chirurgie expérimentale. Les étudiants apprendront à implanter sous la peau des sondes d'enregistrement de l'électrocardiogramme, de la température et de l'activité d'enregistrement. Puis, ils participeront à l'analyse de signaux électrocardiographiques.

L'intérêt de la télémétrie dans la caractérisation de fonction électrique cardiaque est de réduire le nombre d'animaux en expérimentation, augmenter la véracité scientifique des données acquises (acquisition en vigile, non anesthésié, non contraint) et donc participer au raffinement des signaux. 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 est réalisée sous anesthésie. Lorsqu'elle est réalisée en laboratoire, les souris implantées sont hébergées avec d'autres souris non implantées (pour éviter toute interférence) ce qui permet de ne pas les isoler et ainsi réduire leur stress. Soixante souris seront utilisées pour la durée du projet (12 par an pour une durée de 5 ans).

9984 Nous envisageons de mettre au point un suivi de deux pathologies grandement handicapantes et mortelles de la population des pays industrialisés, avec des techniques non invasives.

1. Les glioblastomes (GB), sont les tumeurs cérébrales primitives rencontrées le plus fréquemment chez l'adulte et qui présentent une médiane de survie n'excédant pas 15 mois. Ce sont des tumeurs hautement hypoxiques, or, cette hypoxie intra-tumorale représente un obstacle majeur à l'efficacité des traitements conventionnels que sont la radiothérapie et la chimiothérapie. L'hypoxie est à ce titre associée à un très mauvais pronostique.

Plusieurs stratégies de réoxygénation des GB ont été proposées afin de palier l'hypoxie dans les glioblastomes mais celles-ci se sont avérées inefficaces car c'est le cerveau sain et non la tumeur qui bénéficie le plus de la réoxygénation.

Nous proposons l'utilisation l'imagerie non invasive par imagerie par résonance magnétique (IRM) afin d'optimiser les séquences visant à visualiser et quantifier cette hypoxie locale pour permettre une stratégie efficace et ciblée spécifiquement aux zones affectées principalement par ces foyers hypoxiques.

2. Les accidents vasculaires cérébraux (AVC) représentent la première cause de morbidité et la deuxième cause de mortalité chez l'homme dans les pays industrialisés. Le tribut à payer à cette pathologie reste très lourd : 10 à 12 % de l'ensemble des décès après 65 ans ainsi que des séquelles physiques, cognitives ou psychologiques chez plus de la moitié des victimes. En conséquence, le retentissement socio-économique des AVC est très important. La majorité (80%) des AVC sont de type ischémique, causés par une occlusion artérielle.

Durant les 30 dernières années, plusieurs modèles animaux ont été développés, essentiellement chez les rongeurs, pour étudier la physiopathologie et la thérapie de l'ischémie cérébrale.

Dans ce cadre, nous souhaitons optimiser la mise en place des nouvelles séquences d'IRM afin de quantifier l'extension et la perméabilité vasculaire (perfusion) des zones affectées suite à une interruption localisée de l'afflux sanguin par accident cérébro-vasculaire.

Cette étude, nécessite d'avoir deux procédures chirurgicales associées à ces deux modèles :

1. Une tumeur de type glioblastome sera implantée chez le rat (10 rats wistar) avec 5 contrôles.

2. Un AVC expérimental sera induit à un groupe de souris (10 souris swiss) avec 5 contrôles. Les animaux bénéficieront ensuite d'examens d'imagerie afin de suivre ces pathologies.

Les procédures à mettre en place sont basées sur l'expérimentation animale, prennent en compte le bien-être animal et les pratiques éthiques, et répond à la règle des 3 R (remplacer, réduire, raffiner) comme décrit ci-dessous.

Le remplacement de ces modèles animaux n'est pas possible, le recours à des animaux est justifié par la nécessité d'étudier les deux pathologies à étude dans un environnement in vivo tenant compte de tous les aspects du microenvironnement tumoral lié aux glioblastomes et hypoxique lié à l'AVC. Ces environnements complexes (cellules tumorales, inflammation, hypoxie, vascularisation) dans

un organe spécifique qu'est le cerveau et d'un organisme entier, ne peuvent pas se retrouver dans des méthodes de substitution.

Concernant la réduction du nombre final d'animaux strictement nécessaire, le nombre d'animaux a été calculé afin d'assurer un nombre minimal d'animaux permettant d'obtenir des résultats homogènes. Notre expertise des modèles tumoraux de GB et d'AVC ont pu montrer que 10 animaux par groupe sont nécessaires afin de réaliser des tests statistiques, avec 5 animaux contrôle par groupe. Les animaux utilisés seront au nombre de 10 rats Wistar pour le modèle tumeur avec 5 contrôles et 10 souris.

Les examens d'imagerie dont bénéficient ces animaux sont non invasifs et les procédures menées dans ce projet se réalisent sous anesthésie générale et contrôle de fréquence respiratoire et température. De plus, une anesthésie locale est appliquée au niveau de la suture cutanée. En péri-opératoire et post-opératoire, l'analgésie est assurée par injections de buprénorphine.

Une surveillance post-opératoire est effectuée tous les jours pour les animaux modèles par du personnel formé, visant à vérifier des signes de souffrance. Le bien-être des animaux sera surveillé 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 de la naissance à la mort de l'animal. Cependant, l'ensemble des connaissances et des acquis dont nous disposons au laboratoire montre que les animaux se déplacent et s'alimentent normalement, prennent bien soin de leur pelage, n'émettent aucun son et ne présentent aucun « sickness behavior syndrom ».

9985 Cette demande concerne le renouvellement de l'agrément pour la formation réglementaire "Chirurgie expérimentale". Les travaux pratiques de "Chirurgie " permettent aux participants d'acquérir les notions de bases et d'appréhender la mise en place, la réalisation et le suivi post-opératoire nécessaires pour effectuer une chirurgie simple chez les rongeurs.

Dix chercheurs (déjà habilités pour la conception de projet) seront formés par an. Les intervenants feront tout d'abord des démonstrations de chirurgie légère puis chaque participant réalisera une chirurgie (vasectomie sur souris) sous contrôle des encadrants. Le nombre total d'animaux euthanasiés par an est de 14, soit 70 pour 5 ans. Le nombre total correspond à une souris par participant et par an, ainsi que 4 souris de démonstrations (2 mâles et 2 femelles) pour les intervenants et par an. Chaque participant doit pouvoir se confronter à la mise en place, la réalisation et le suivi d'une chirurgie légère.

Les animaux sont hébergés en cages standard (respect du nombre d'animaux par cage, nourriture et boisson à volonté) avec pour enrichissement des copeaux en grande quantité. Pour toute chirurgie les animaux seront préalablement anesthésiés et la profondeur de l'anesthésie sera vérifiée selon les recommandations. Durant l'anesthésie les animaux sont placés sur des tapis chauffants.

9986 Les défauts osseux consécutifs aux pseudarthroses (non consolidation de fracture), fractures complexes, reprises de prothèses et tumeurs concernent de nombreuses interventions orthopédiques. Ces défauts de grande taille peuvent requérir la mise en place d'une greffe osseuse provenant du patient, qui présente des problèmes de disponibilité et/ou de qualité de l'os prélevé. L'ingénierie tissulaire osseuse, qui consiste à combiner un biomatériau et des cellules capables de produire de la matrice osseuse (cellules souches ostéoprogénitrices), est une alternative prometteuse mais qui nécessite d'être encore optimisée.

Une approche pour améliorer les produits d'ingénierie tissulaire est d'optimiser la composante cellulaire. Les cellules ostéoprogénitrices les plus prometteuses en thérapie cellulaire sont les cellules souches mésenchymateuses adultes (CSMs), présentes dans la plupart des tissus conjonctifs postnataux, et dotées de propriétés multipotentes, c'est à dire capables de se différencier en différents types cellulaires, en particulier en cellules osseuse, du cartilage et du tissu adipeux. Les deux principales sources de CSMs pour la thérapie cellulaire sont la moelle osseuse et le tissu adipeux car facilement prélevables en grande quantité. Par ailleurs, des précédents travaux de recherche indépendants ont montré que la prédifférenciation des CSM dérivées de la moelle osseuse vers un phénotype plus mature (ostéoblaste ou adipocytaire) augmente

significativement leur potentiel de formation osseuse, avec néanmoins des résultats contradictoires qui nécessitent des études complémentaires tant au niveau expérimental qu'au niveau cognitif.

L'objectif de ce projet est (1) de comparer le potentiel de formation osseuse de deux types de CSMs (dérivées de la moelle osseuse et du tissu adipeux) ; (2) d'évaluer l'impact de la prédifférenciation de ces CSMs sur cette formation; (3) de caractériser (impact de l'inflammation, de la vascularisation) les implants au cours du temps de formation. Enfin, (4) nous évaluerons l'efficacité thérapeutique de la préparation de CSMs « optimale » à réparer un grand défaut osseux.

Aucun modèle de néoformation osseuse in vitro n'est disponible aujourd'hui. Le tissu osseux regroupe, en effet, plusieurs familles cellulaires ayant chacune son propre rôle dans le remodelage et l'homéostasie osseuse elle-même régulée par un système hormonal complexe. Le modèle souris immunodéficientes Nude sera utilisé car bien caractérisée pour évaluer la formation osseuse induite par les CSMs.

Deux modèles d'implantation seront utilisés : (1) un modèle d'implantation des produits d'ingénierie tissulaire osseux en sous cutané car il permet d'évaluer le potentiel ostéogène des CSMs per se sans influence de tissu osseux adjacent ; il est en outre facile à réaliser, moins douloureux pour l'animal et permet de nombreuses analyses ex vivo. (2) un modèle d'implantation des produits d'ingénierie tissulaire osseux dans un modèle de grande perte de substance osseuse fémorale pour évaluer l'efficacité thérapeutique de réparation. L'évaluation longitudinale de la formation osseuse induite par les produits d'ingénierie tissulaire sera effectuée par imagerie rayons X, une technique non invasive. L'ensemble du projet d'une durée de 4 ans, nécessite l'utilisation de 95 souris Nude, souris immunodéprimées pouvant recevoir des cellules d'origine humaine.

3R : La validation de l'efficacité thérapeutique des produits d'ingénierie tissulaire osseux permettra d'envisager de les tester dans des modèles animaux précliniques et à plus long terme à la mise au point de traitements des grandes pertes de substance osseuse chez l'homme.

Afin de diminuer le nombre d'animaux, 4 implants seront implantés en sous-cutané par animal. Par ailleurs, des techniques d'imagerie non-invasive seront utilisées pour suivre la formation osseuse par micro-scanner. La dernière étape ne se fera qu'en utilisant la meilleure préparation de cellules déterminée dans les étapes précédentes.

Une analgésie se fera en pré- et post-opératoire suivie d'une observation régulière de l'animal jusqu'à la fin de l'étude (de 8 à 10 semaines post-implantation). Un certain nombre de points critiques seront surveillés permettant d'évaluer la présence éventuelle de souffrance ou douleur. Au cas où des douleurs ou souffrances persisteraient en dépit des traitements entrepris, la décision de euthanasie sera prise. Les animaux seront hébergés dans des conditions permettant un enrichissement social (3 par cage) et l'expression de comportement de fouissage, de nidification et de rongement.

9987 De nombreuses pathologies cutanées (cancers, sclérodémie, eczéma, psoriasis) sont associées à des anomalies de la vascularisation et de l'oxygénation de la peau.

Il n'existe pas à l'heure actuelle de méthode non invasive pour évaluer ni l'oxygénation tissulaire qui permettrait d'aider au diagnostic de ces pathologies, ni, de façon très précoce, l'efficacité de nouvelles approches thérapeutiques.

Il est donc d'un très grand intérêt de développer de nouvelles technologies pour mesurer de façon non invasive et en temps réel l'oxygénation tissulaire au niveau de la peau.

Un système optique prototype a été mis au point pour cette application et a déjà prouvé sa capacité à mesurer l'oxygénation tissulaire de la peau in vivo d'abord chez le rat puis chez le cochon.

L'instrument, de la taille d'un stylo, se place au contact de la peau et collecte des spectres caractéristiques des entités moléculaires présentes sur le point mesuré en réponse à une excitation lumineuse incidente. Il permet ainsi de mesurer les proportions relatives d'hémoglobine oxygénée et désoxygénée et ainsi de mesurer l'oxygénation du tissu.

Afin d'envisager l'utilisation de ce système chez l'homme il est important de vérifier son innocuité pour la zone de peau examinée, y compris dans le cas où la mesure devrait éventuellement être répétée plusieurs fois.

Pour obtenir l'autorisation légale d'utiliser le système chez l'homme une étude réglementaire qui ne peut être conduite que par certains organismes agréés devra être réalisée. Néanmoins des

conditions précises d'utilisation devront avoir été définies au préalable, ce qui permettra de réduire le nombre d'animaux nécessaires à la réalisation de cette étude. Il est donc nécessaire en amont de l'étude réglementaire d'évaluer l'innocuité/toxicité du système optique pour la peau selon différents modes d'utilisation.

Ce projet mettra en œuvre le système prototype appliqué sur un modèle rongeur (rat) et nécessitera l'utilisation de 6 animaux.

Remplacement : Le système a fait l'objet d'une caractérisation physique visant à déterminer les niveaux d'exposition laser auxquels le tissu cutané est susceptible d'être soumis. Néanmoins, les données bibliographiques sont insuffisantes pour conclure fermement sur l'innocuité de ces niveaux. L'utilisation d'animaux est donc incontournable pour évaluer une éventuelle toxicité liée à l'utilisation du système.

Réduction : Cette étude vise à définir les conditions limites d'utilisation du système optique en amont de l'étude réglementaire obligatoire qui sera réalisée par un organisme agréé sur un nombre d'animaux conséquent. L'objectif de cette étude est donc précisément de réduire le nombre d'animaux qui seront utilisés dans l'étude réglementaire en limitant le nombre de conditions qui seront évaluées.

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

Pendant l'examen, une anesthésie sera pratiquée sur l'animal et maintenue tout au long de la procédure qui se terminera sans réveil par l'euthanasie.

L'application de critères d'arrêt permettra d'intervenir immédiatement de manière appropriée en cas de signe de souffrance.

9988 Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) comprennent principalement la maladie de Crohn et la recto-colite hémorragique. Les MICI touchent plus de 200 000 personnes en France et sont souvent diagnostiquées chez des sujets jeunes, âgés de 20 à 30 ans. Ces maladies résultent d'une inflammation chronique d'une partie du tube digestif dont les causes, probablement multifactorielles, ne sont pas clairement connues. Par ailleurs, un lien est établi entre l'inflammation et le développement du cancer. Ainsi, les patients atteints de MICI ont un risque accru de développer un cancer colorectal (deuxième cause de mortalité associée au cancer dans le monde). Si les traitements actuels peuvent diminuer la sévérité des symptômes de MICI, aucun traitement à ce jour n'est complètement efficace et leur utilisation peut être accompagnée d'effets secondaires graves. Il paraît ainsi nécessaire d'envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques.

L'ATP extracellulaire (ATPe) est maintenant largement reconnu comme une molécule de signalisation cellulaire capable, notamment, de réguler l'activité des cellules immunitaires. L'ATPe peut être libéré en grande quantité dans différentes situations physiopathologiques par des cellules en état d'activation et/ou en état de souffrance ou de stress cellulaire (stimulation cellulaire importante, stress oxydatif). Sa concentration peut être élevée au site inflammatoire ou dans l'environnement tumoral. Sur le plan immunologique, l'ATPe correspond à la définition d'un « signal de danger » capable au travers du récepteur pro-inflammatoire P2RX7 d'alerter l'immunité innée (conduisant à l'amplification de la réponse inflammatoire) et de stimuler le développement d'une réponse adaptative. L'ATPe peut aussi agir sur d'autres types cellulaires tels que les cellules épithéliales (notamment les cellules épithéliales intestinales), ou sur les cellules tumorales dont la croissance et le pouvoir métastatique peuvent être stimulés par la stimulation du récepteur P2RX7. Les objectifs de ce projet de recherche sont :

- i) de mieux comprendre le rôle de l'ATPe agissant au travers du récepteur P2RX7 dans le développement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI)
- ii) d'évaluer le rôle anti-tumoral de P2RX7 dans le cancer colorectal associé aux MICI
- iii) de valider l'intérêt thérapeutique d'une nouvelle classe d'anticorps, dénommée "nanocorps" dans les MICI et dans la prévention ou le traitement des cancers colorectaux

Pour cela, nous utiliserons les méthodes et les modèles expérimentaux suivants :

- i) le modèle murin de la colite expérimentale. Ce modèle, largement utilisé dans la communauté scientifique, représente l'un des modèles murins de MICI les plus courants et reproduit une partie des signes et des mécanismes à l'œuvre dans la pathogénèse de cette affection complexe

ii) des modèles murins de souris génétiquement modifiées dans lesquels le récepteur P2RX7 a été invalidé dans l'ensemble des cellules, ou uniquement dans certaines cellules d'intérêt.

iii) des souris injectées avec des vecteurs de thérapie génique codant pour des "nanocorps" fonctionnels, produit in situ, capables de bloquer ou d'activer le récepteur P2RX7 in vivo.

Le nombre de souris d'élevage qui sera utilisé dans cette étude est estimé à 656 (et pourra atteindre au maximum 1494 si certains résultats doivent être confirmés plusieurs fois). Ce nombre prend en compte la nécessité de produire et d'utiliser des groupes expérimentaux comprenant au moins 10 animaux par groupe afin de pallier aux variabilités inhérentes à ce type de modèles expérimentaux. La répétition des expériences permettra aussi de s'assurer de la validité statistique des résultats obtenus et de pallier aux fluctuations expérimentales inhérentes à la variabilité des réponses (notamment immunologiques). En conformité avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement (3R), aucune méthode de substitution, incluant les modèles de tissus in vitro et la modélisation informatique, ne permet à ce jour de rendre compte de la complexité des MICI et du cancer colorectale associé. Les expériences ne seront reproduites 3 fois que dans le cas où le résultat de la première expérience valide l'hypothèse de travail et nécessite dans ce cas d'être confirmé (en accord avec les exigences scientifiques de reproductibilité). En conformité avec l'exigence de raffinement, nous avons prévu l'utilisation de méthodes d'anesthésie, analgésie et de réhydratation afin d'améliorer le bien-être des animaux. Dans le cadre du raffinement des conditions d'hébergement, ces animaux sociables seront maintenus en groupe dans des cages enrichies. De plus, les animaux seront sous observation quotidienne et seront sujets à une attention et à des soins appropriés pendant le développement de la maladie afin de leur assurer un bien-être optimal. Les animaux seront euthanasiés dès que l'un des points limites, fixés sur la base de l'apparition des signes cliniques caractéristiques, sera atteint.

Le rationnel et la pertinence scientifique de ce projet ont été évalués et approuvés par 4 experts extérieurs et par un comité scientifique. Ce projet est réalisé avec la collaboration de 3 autres équipes sur le territoire national financé dans le cadre de ce projet.

9989 Contexte

Les autorités de santé demandent la démonstration de l'activité et de l'identité virale des lots commerciaux de chaque vaccin via des contrôles qualité qui ont pour finalité l'autorisation de mise sur le marché (AMM). De ce fait, la sécurité des lots de vaccins peut être évaluée sur des modèles animaux.

Objectifs

Le projet a pour objectif de qualifier le personnel à la technique d'efficacité par épreuve rage sur espèce alternative (souris). Cette technique vise à être en conformité avec les exigences réglementaires de la Pharmacopée Européenne et des pays tiers destinataires, dans la constitution d'un dossier d'AMM pour un vaccin.

Former et qualifier du personnel compétent pour utiliser les modèles rongeurs permet de garantir une commercialisation de vaccins efficaces et sûrs qui protègent l'animal de la maladie.

Dommages/avantages :

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

Les animaux témoins montrent les symptômes sévères liés aux maladies testées. Des points limites spécifiques aux pathologies sont appliqués.

La période de formation/qualification est supervisée par du personnel formé et compétent.

Les tests de contrôle qualité permettent la libération d'un nombre important de doses de vaccins qui protègent les animaux, et indirectement, l'homme, contre la rage.

Informations sur les espèces utilisées

Pour former et qualifier 10 personnes sur une période de 5 ans, nous utiliserons au maximum 2830 souris.

Mise en œuvre des 3Rs :

Remplacement : la Pharmacopée Européenne et les réglementations des pays tiers destinataires du produit exigent des tests sur animaux pour l'AMM. Il n'est actuellement pas possible de les remplacer sans un changement de la réglementation de ces pays.

Réduction : le nombre d'animaux est défini au plus juste selon la pharmacopée correspondant à l'activité du vaccin rabique inactivé pour usage vétérinaire.

Raffinement : Des points limites spécifiques aux pathologies sont déterminés pour les témoins non vaccinés. Le personnel vérifie l'évolution de l'état général et si les points limites spécifiques sont atteints, la souris est euthanasiée. Le personnel est compétent pour identifier les cas pour lesquels l'animal n'est plus dans sa zone de confort. Les conditions d'hébergement varient selon l'espèce et l'âge des animaux pour maximiser leur confort et leur bien-être. Tous les animaux sont hébergés en groupe et 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.

9990 Les cancers urologiques (rein, prostate, vessie) représentent 20% des cancers, pratiquement 15% des décès liés au cancer et sont en progression constante. Aux stades avancés, ils sont réfractaires à toutes thérapies malgré le développement des thérapies ciblées. De nouvelles options thérapeutiques doivent donc être impérativement développées. Les tumeurs urologiques se caractérisent par une grande variabilité entre les individus et sont très hétérogènes. Or, jusqu'à présent, les modèles d'étude préclinique se basent sur les lignées cancéreuses qui ne reflètent pas cette hétérogénéité. Ainsi, malgré le développement de cultures 3D dont la mise en œuvre reste difficile, les modèles animaux s'avèrent toujours indispensables. L'approche par xénogreffe, c'est-à-dire une greffe, chez la souris immunodéficente, de tumeurs humaines directement obtenues à partir de patients au moment de la chirurgie, reproduit fidèlement les caractéristiques des tumeurs humaines et apparaît comme le modèle d'étude le plus pertinent mais est encore très peu répandu dans la sphère urologique. Les implantations seront réalisées sous anesthésie générale et un analgésique sera ajouté dans l'eau de boisson durant trois jours après la chirurgie.

Aussi, nous nous proposons de mettre en place une importante plateforme de xénogreffes tumorales issues de patients pour les cancers urologiques et de proposer ces modèles pour une évaluation fiable de candidats médicaments.

Les tumeurs de patients seront dans un premier temps fragmentées et greffées sur 6 animaux, soit en sous-cutané, soit sous la capsule rénale. Puis, les greffes qui auront pris suite à la primo-implantation seront établies grâce à plusieurs passages successifs en sous-cutané, délai pendant lequel la capacité des différents modèles à être congelés sera testée. Enfin, les tumeurs supportant la congélation seront amplifiées pour faire un stock de fragments congelés et pour tester plusieurs molécules de référence. Les tumeurs seront ensuite utilisées pour tester l'efficacité de candidats médicaments. L'ensemble de ces étapes nécessitera l'utilisation de 7050 souris immunodéficientes. Pour ce projet, la règle des 3R sera respectée de la façon suivante :

Aucune méthode de remplacement n'existe malheureusement à ce jour, comme expliqué précédemment.

Nous avons réduit au maximum le nombre d'animaux utilisés pour les différentes étapes du développement des xénogreffes tout en créant une banque suffisamment représentative de la diversité de la maladie, en limitant le nombre d'animaux par échantillon prélevé à 6, pour chaque passage et pour les tests de décongélation, et à 10 par groupe pour les tests d'efficacité anti-tumorale de molécules de référence et de candidats médicaments, nombre minimum pour avoir des résultats statistiques.

Le raffinement sera assuré par différents types d'enrichissement des cages pour le confort des animaux tels que :

- des carrés de coton pur permettant aux animaux de faire une nidification ;
- des bâtons à ronger permettant aux souris d'assouvir leurs besoins de rongement et limitant les querelles entre souris mâles.
- des igloos permettant le jeu et le repos des animaux.

Les souris seront nourries ad libitum et hébergées en groupe; elles ne seront séparées qu'en cas de comportement agressif. Durant toute la période d'expérimentation, l'état général des animaux sera observé tous les jours.

De plus, nous avons établi des points limites qui mettront fin à l'expérimentation si nécessaire :

- altération des fonctions normales (impossibilité d'uriner, de se nourrir, de s'alimenter, etc.),

- présence d'une souffrance/douleur (vocalisation, perte d'appétit, poil hérissé, prostration, etc.),
- une perte de poids $\geq 20\%$ du poids initial sur 24h,
- une ulcération tumorale,
- un volume tumoral excédant 10% du poids de l'animal correspondant typiquement à un volume de 2500 mm³ pour une souris de 25 g.

9991

La prévalence du diabète de type 2 à la Réunion est 2 fois plus importante qu'en métropole et la surmortalité associée y est 3,5 fois plus importante. L'augmentation des facteurs de risque (obésité, surpoids, sédentarité, mauvaise alimentation) laisse présager une augmentation de la prévalence du diabète à la Réunion dans les années à venir. La neuropathie diabétique (ND) est l'une des complications chroniques les plus fréquentes du diabète. Elle concerne les atteintes du système nerveux périphérique, c'est-à-dire les nerfs sensitifs et moteurs ainsi que les nerfs du système nerveux autonome qui commandent nos organes. La ND perturbe considérablement la sensibilité à la douleur et au toucher. Chez certains patients, elle provoque des douleurs terribles au contact d'un simple drap et chez d'autres au contraire, elle peut rendre indolore une blessure au pied. Ces blessures au pied peuvent facilement s'infecter et mener à la gangrène et à l'amputation. Ces complications au niveau du pied ont une incidence économique et sociale très importante, avec un risque d'amputation multiplié par 10 à 15 chez le diabétique. Actuellement, les thérapies pour traiter les ND sont d'une part de rééquilibrer la glycémie (non efficace pour le diabète de type 2) et d'autre part d'utiliser des molécules ciblant les douleurs d'origine nerveuses.

Dans l'objectif d'étudier cette pathologie et de proposer de nouvelles approches thérapeutiques, nous proposons de développer deux modèles de ND chez la souris en utilisant : 1) Un modèle de souris pré-diabétique induit par un régime riche en lipide. 2) Un modèle de souris diabétique de type 2 (souris db/db). Ces deux modèles murins développent des ND au cours du temps. Nous évaluerons la neuropathie en réalisant des tests sensoriels et moteurs. L'utilisation de modèles murins de ND est couramment utilisée en recherche et présente l'avantage de mimer les déficits sensoriels (perte de sensibilité tactile et douloureuse) ainsi que les lésions périphériques (diminution de l'innervation au niveau de la peau) observés chez les patients. Pour la mise en place des modèles de ND, nous utiliserons un maximum de 80 souris.

Nous serons particulièrement vigilants afin de développer nos protocoles dans le respect de la règle des 3R :

Remplacement : Pour ce projet, le recours à l'expérimentation sur des animaux vivants est indispensable car la ND est impossible à reproduire sur des modèles *in vitro* simplifiés. Le modèle de ND est couramment utilisé chez la souris car elle permet de reproduire les déficits observés chez l'homme. Les études seront systématiquement optimisées d'après la littérature et/ou les observations réalisées au laboratoire.

Réduction : L'utilisation des animaux sera réduite au maximum et les expériences seront planifiées et réalisées les unes après les autres afin d'éviter des pertes inutiles. L'application de cette politique de réduction mise en place permettra d'optimiser au mieux chaque expérimentation afin de retirer un maximum d'information d'un minimum d'animaux.

Raffinement : Les protocoles sont réfléchis afin de réduire la douleur et la détresse de l'animal. Les animaux seront sous la surveillance de personnes habilitées à manipuler les animaux et la diffusion par ces personnes de leur savoir-faire permettra de réaliser nos expérimentations dans le respect de l'animal et des conditions optimales du suivi des règles d'hygiène et de sécurité. Tous les animaux sont hébergés dans un service de zootechnie ayant un environnement enrichi qui a été agréé par le ministère.

9992

Les sarcomes représentent environ 1% des cancers et sont issus de cellules transformées d'origines mésenchymateuses. Ce sont donc des tumeurs issues de différents lignages cellulaires tels que les cellules osseuses (ostéosarcomes), cartilagineuses (chondrosarcomes) ou de soutien des viscères (sarcomes des tissus mous). Leurs principales caractéristiques sont leur agressivité et leur facilité à envahir les tissus environnants, mais également à se disséminer loin de la tumeur primitive sous forme métastatique. Une des formes des sarcomes sont les sarcomes à génétique complexes démontrant un génome très remanié et hétérogène. La compréhension de

l'oncogenèse menant à ces génomes permettrait d'améliorer considérablement le soin des personnes atteintes.

Dans le cadre de l'étude de ces génomes, nous avons démontré qu'ATRX est le 3ème gène le plus altéré et son expression est généralement perdue. Les analyses in vitro ont ainsi pu démontrer une augmentation de l'agressivité des cellules tumorales lors de la suppression de l'expression d'ATRX. Ce projet est envisagé ici car il n'existe pas de modèles alternatifs in vitro ou in silico, qui nous permettraient de montrer dans des conditions les plus physiologiques possibles que la perte du gène étudié puisse générer la formation de tumeurs et /ou favoriser la croissance tumorale.

Nos expériences ont pour finalité l'amélioration de la santé humaine et l'expérimentation in vivo est non substituable à aucune autre méthode car nous avons besoin d'un organisme complet pour étudier le développement des tumeurs. L'utilisation de ces techniques non-invasives permet ainsi d'observer au cours du temps un seul animal simplement anesthésié permettant de réduire sensiblement le nombre d'animaux utilisés. Ainsi 20 souris NSG (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ) seront utilisées pour l'ensemble de l'expérience. Durant toute la période d'expérimentation, afin de limiter la souffrance des animaux, l'état général des animaux sera observé quotidiennement au cours des expérimentations et en cas de souffrance ils seront traités par analgésiques ou euthanasiés, si nécessaire. Le week-end le suivi des animaux sera assuré par les zootechniciens diplômés. Les points limites entraînant l'euthanasie seront une perte de poids supérieure à 20%, une ulcération de la tumeur, un comportement moribond ou une auto-mutilation. Un enrichissement de type carré de sopalin et/ou carton sera rajouté aux animaux leur permettant ainsi de faire une nidification. Ainsi, ce projet sera réalisé selon les exigences de la règle des 3 R (remplacement, réduction et raffinement) et la directive européenne 2010/63/UE.

9993 Le cœur de la femme est connu pour avoir une meilleure résistance au stress cardiovasculaire avant la ménopause par comparaison aux hommes et cette différence est attribuée au rôle protecteur des hormones sexuelles, en particulier des œstrogènes. Au cours de leur vie, les femelles connaissent de forts changements hormonaux, notamment lors de la grossesse qui s'accompagne d'une hypertrophie physiologique réversible du cœur, considérée comme une adaptation cardiaque à l'augmentation du volume sanguin circulant. Néanmoins, la majorité des études sur l'hypertrophie cardiaque pendant la grossesse se focalisent sur la fin de grossesse et non pas sur son évolution. De plus, les mécanismes moléculaires responsables de cette hypertrophie cardiaque restent encore inconnus.

Les cellules contractiles du cœur (les cardiomyocytes) présentent une architecture particulière avec une alternance de creux et de crêtes au niveau de leur membrane latérale. Cette organisation architecturale disparaît lors d'une ischémie myocardique compliquée d'insuffisance cardiaque. Des travaux antérieurs ont mis en évidence la mise en place tardive des crêtes au cours de la maturation post-natale et la différenciation du cardiomyocyte adulte. De façon intéressante, des cardiomyocytes ne possédant pas cette architecture de surface sont plus à même de présenter un potentiel de régénération dans un contexte de stress cardiaque par prolifération des cardiomyocytes.

Dans ce contexte, afin de comprendre les mécanismes moléculaires rendant compte de la résistance au stress cardiovasculaire chez la femme non ménopausée, nous souhaitons étudier de façon comparative l'architecture de surface des cardiomyocytes chez des souris mâles et femelles, ainsi que dans un modèle de stress physiologique peu étudié : la gestation.

Cette étude utilisera 135 animaux au maximum répartis en 9 cohortes de 12 souris (la taille des cohortes pourra être portée à 15 en cas de besoin) : 7 cohortes de souris femelles adultes nullipares, gestantes ou ayant mis bas ainsi que 2 cohortes de souris mâles. Les objectifs sont 1/ comparer l'architecture de surface des cardiomyocytes chez les mâles et les femelles adultes (8-10 semaines) et 2/ étudier l'effet de la gestation sur l'architecture de surface des cardiomyocytes. L'évolution au cours de la gestation sera comparée aux données obtenus chez la femelle nullipare adulte (point 1/). Pour chaque cohorte, les souris subiront une analyse morphologique et fonctionnelle in vivo sous anesthésie générale par échocardiographie. Après euthanasie, une analyse in vitro permettra d'apprécier les conséquences de la gestation sur l'architecture du tissu cardiaque.

La règle des 3R sera appliquée dans ce projet :

- Remplacement : Il n'existe pas de moyen alternatif pour l'étude de l'effet du genre et de la gestation sur l'architecture du tissu cardiaque. Ceux-ci dépendent en effet, non seulement de l'influence de facteurs hormonaux mais également d'adaptations physiologiques telle l'augmentation du volume sanguin circulant lors de la gestation et donc imposent le recours à l'animal.
- Réduction : L'organisation de l'expérience permet de réduire au maximum le nombre d'animaux. Ainsi, la taille des 9 cohortes a été déterminée afin d'obtenir des résultats statistiquement exploitables. Le nombre maximum utilisé dans ce projet sera de 135.
- Raffinement : les animaux seront acclimatés avant le démarrage du projet. Les animaux seront hébergés en groupe et des enrichissements (coton, cellulose bûchettes) seront introduits dans la cage afin de favoriser les comportements naturels et diminuer l'agressivité. L'échocardiographie sera réalisée sous anesthésie générale. Tout au long de l'expérimentation, une procédure de suivi quotidien du bien-être des animaux, adaptée à l'expérience et à l'évaluation des potentiels effets indésirables liés procédures sera mise en place.

9994 Malgré un taux de réponse élevé après chimiothérapie, la survie globale des patients atteints de leucémies aiguës myéloïdes (LAM) est encore médiocre, essentiellement en raison des rechutes causées par la résistance à la chimiothérapie intensive. Il est de plus en plus reconnu que cette résistance serait due à une sous-population rare de cellules leucémiques. Ainsi, le développement de modèles précliniques pour tester in vivo de nouvelles thérapies ciblant ces cellules responsables de la rechute est un besoin urgent pour le traitement des LAM. Il a été développé un modèle rongeur greffé avec les cellules tumorales des patients leucémiques qui permet de reconstituer cette pathologie, d'étudier les cellules souches leucémiques et plus récemment d'analyser la réponse à certaines thérapies ciblées ou aux chimiothérapies conventionnelles. Ce modèle murin est une souris, très immunodéficente, dont on connaît très mal la composition sanguine. Il est donc indispensable de caractériser la composition sanguine normale de cette souris immunodéficente pour savoir si les anomalies détectées sur des souris greffées sont réellement anormales où font partie des particularités hématologiques de ces souris. Le but de notre étude est donc d'établir les valeurs normales de concentration des différents composants du sang de ces souris immunodéficientes ainsi que de caractériser la composition de leur moelle osseuse. Pour cette étude, le remplacement n'est pas envisageable car nous avons besoin de caractériser la souche NSG mais nous avons pris soin de réduire au maximum le nombre d'animaux prévus, soit 20 souris, nombre minimum pour pouvoir définir les valeurs normales que nous recherchons. Les souris incluses dans notre étude devront présenter toutes les caractéristiques d'un animal "normal" et donc en bonne santé. Les souris seront hébergées dans une animalerie dédiée par groupe de 5 maximum dans des cages agrémentées de tunnels ou d'igloos pour que les animaux aient une meilleure stimulation sociale. Ces conditions d'hébergement 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. Dans un souci de raffinement des procédures, les prélèvements sanguins sur animaux vivants se feront sous anesthésie générale avec des marqueurs précoces de réveil (principalement l'augmentation de la fréquence respiratoire) afin d'assurer aux animaux une narcose suffisante pour qu'il n'y ait pas de douleur ressentie. La fin de la procédure est marquée par l'euthanasie des animaux sous anesthésie générale sans réveil préalable. Cette euthanasie est inévitable compte-tenu du volume sanguin qui est nécessaire pour notre étude et qui est totalement incompatible avec le réveil des animaux. Les souris de notre étude ne subiront donc aucune procédure autre que le transfert de leur cage à la boîte à induction, sous anesthésie générale, ce qui satisfait à la règle des 3Rs en remplissant les critères du Raffinement des procédures (Stress réduit au maximum et douleur absente), le principe de Réduction ayant déjà été suivi par le choix d'un nombre restreint d'individus et le Remplacement n'étant pas possible compte-tenu de la teneur de nos objectifs.

9995 Les missions du Laboratoire d'étude sont inscrites dans une démarche générale de contribution à un ensemble de questionnements à la fois scientifiques et sociétaux dans le domaine général de la santé publique. Ses missions concernent de façon plus précise l'apport de données alimentant à la fois la connaissance académique et l'évaluation du risque associés à l'exposome chimique de

l'Homme, historiquement dans le domaine de la sécurité sanitaire des aliments, et aujourd'hui également dans le domaine de la santé environnementale.

Ses objectifs sont ainsi (1) de caractériser la présence et le devenir des contaminants chimiques de l'environnement à l'Homme via la chaîne alimentaire, (2) de caractériser les signatures biologiques associées à ces expositions, et enfin (3) d'amener ces marqueurs d'exposition et/ou d'effet, et plus largement la connaissance produite, jusqu'à une interprétation et exploitation finalisée à l'interface environnement-alimentation-santé.

Dans le cadre de ses activités de référence pour la Direction Générale de l'Alimentation (DGAI), et de ses activités de recherche, le Laboratoire est ainsi notamment amené à générer de la connaissance nouvelle relative au métabolisme chez l'animal de production de résidus et contaminants chimiques, afin d'être en mesure de proposer aux autorités compétentes des données scientifiques nécessaires d'une part à l'évaluation mais aussi la gestion des risques associés.

Dans le cas de résidus chimiques de promoteurs de croissance interdits en élevage (Directive 96/22/EC) (stéroïdes, β -agonistes, somatotropine, thyrostatiques), il s'agit notamment d'établir les cinétiques d'élimination chez l'animal (ruminants/porcins) des résidus administrés, d'en étudier le métabolisme afin de proposer les métabolites pertinents et les matrices biologiques les plus adaptées pour le contrôle des pratiques associées.

En ce qui concerne les contaminants chimiques de l'environnement (dioxines, PCBs, RFBs, contaminants émergents), il s'agit d'étudier les effets chez l'animal d'une exposition à ces substances. L'objet est ici d'une part de générer des données de contamination des matrices d'intérêt en alimentation humaine au regard des teneurs réglementaires, d'autre part de fournir des matrices biologiques permettant l'exploration des effets associés à ces contaminants, le plus souvent présents en cocktail dans l'environnement et doués de propriétés de perturbateurs endocriniens.

L'objet de la présente demande est de regrouper au sein d'un même dossier l'ensemble des besoins du laboratoire associés à l'exposition des animaux de production à des résidus et contaminants chimiques. L'objet de ces différentes expérimentations est le même, il s'agit de collecter des matrices biologiques d'intérêt, sur animal vivant (sang, urine, fèces, poils, lait) et après euthanasie (muscle, foie, poumon, rein, rétine, etc.). Les espèces cibles et le nombre d'animaux par espèce sont les suivants : 25 animaux au total, d'espèce bovine, porcine, caprine et/ou ovine (répartition entre les différentes espèces en fonction des besoins identifiés du fait de la nature du contaminant et/ou de la demande institutionnelle)

Dans le cadre des 3Rs :

Remplacer : Il n'existe pas de modèle *in vitro* permettant de simuler l'accumulation des résidus et contaminants chimiques dans les tissus et organes vivants

Réduire : Le nombre d'animaux a été choisi afin de limiter le nombre d'animaux utilisés tout en garantissant un échantillonnage suffisant pour avoir des résultats représentatifs de la population à large échelle.

Raffiner : Afin de réduire le stress, les animaux sont manipulés par des opérateurs expérimentés à l'aide de techniques de manipulation basées sur le renforcement positif. Les techniques de prélèvement sur animal vivant (prise de sang, collecte de lait à la mamelle, poils) sont réalisées en appliquant les principes du geste minimalement invasif.

9996 Les facteurs génétiques, l'activité physique et les nutriments sont des déterminants du développement des maladies métaboliques chroniques telles que le diabète de type 2, les maladies cardiovasculaires, les hépatopathies métaboliques. Parmi les nutriments, les acides aminés alimentaires sont de puissants régulateurs de l'homéostasie énergétique, dont le foie est un régulateur central. Les hépatokines, protéines secrétées par le foie, ont récemment émergé comme des cibles intéressantes pour le développement de nouveaux traitements des maladies métaboliques. l'hépatokine FGF21, est une hormone principalement produite par le foie et exerçant des effets systémiques sur le métabolisme et la croissance. L'expression de FGF21 est très sensible aux conditions nutritionnelles.

En réponse au jeûne, l'expression hépatique de FGF21 est contrôlée par PPAR α , un facteur de transcription de la famille des récepteurs nucléaires. La production de FGF21 est aussi induite en

réponse à une restriction protéique. La question est alors posée de savoir si dans ces conditions, PPAR alpha joue aussi un rôle.

Dans ce projet nous disposerons d'un groupe d'animaux (souris) déficients pour le récepteur (PPAR LKO) et un groupe d'animaux non déficients (WT). Les effets attendus sont dépendants d'un dialogue inter-organe faisant intervenir le foie, le tissu adipeux, le muscle par exemple ; il est donc indispensable pour répondre aux questions posées dans cette étude de travailler sur des animaux vivants. Les expérimentations seront réalisées sur 8 groupes de souris composés uniquement de mâles afin de réduire le nombre d'animaux en expérimentation. Chaque groupe sera composé de 8 animaux soit un total de 64. Le nombre d'individus par groupe retenu permet de conserver une puissance statistique convenable telle qu'elle a été définie dans des expérimentations comparables. Pour mimer une carence protéique qui induira FGF21, les animaux seront exposés pendant 4 heures soit à l'halofuginone, un médicament vétérinaire, soit à un aliment carencé en un acide aminé essentiel. Au bout de ce temps, les animaux seront euthanasiés et différents organes et le sang seront collectés. Nous rechercherons ainsi à savoir si la production de cette hépatokine est dépendante ou non de PPAR alpha dans ces conditions de restriction protéique. Ces deux approches permettront donc d'étudier l'expression de l'hépatokine d'intérêt sans induire de souffrance chez les animaux et se feront selon un protocole bien établi préalablement publié. Si toutefois une souffrance animale était remarquée nous prendrons les dispositions réglementaires nécessaires pour la soulager.

9997 Les troubles anxiodépressifs sont des atteintes neuropsychiatriques complexes et invalidantes, caractérisées par une apathie, un ralentissement cognitif, une perte de plaisir et d'intérêt, un retrait social, des idées noires parfois suicidaires. Ils touchent environ 5% de la population mondiale. Les antidépresseurs actuellement prescrits bien qu'efficaces, présentent des inconvénients majeurs comme un long délai d'action et de nombreux effets secondaires.

De plus, un tiers de patients dépressifs est résistant aux antidépresseurs. Ces molécules ont des mécanismes d'action similaires, en effet elles ont toutes pour cibles les systèmes monoaminergiques (sérotonine, dopamine, noradrénaline).

Il y a donc urgence à découvrir et développer de nouvelles molécules médicaments ayant des mécanismes d'action différents et prenant en compte les différents aspects des troubles anxiodépressifs.

Chez le rongeur de laboratoire, plusieurs modèles d'étude miment plus ou moins fidèlement les troubles anxiodépressifs et permettent de disséquer les mécanismes moléculaires et tester des molécules médicaments.

Notre équipe a montré que l'expression de certaines phospholipases A2 sécrétées (sPLA2) est différenciellement modulée dans le cerveau des souris atteintes de troubles anxiodépressives. L'intérêt biologique des sPLA2 repose sur leur implication dans l'inflammation. L'implication de certains membres de cette famille de gènes est connue dans les cas de polyarthrite rhumatoïde ou de choc septique, mais leur rôle dans les fonctions cérébrales reste très peu exploré. Les résultats préliminaires obtenus au laboratoire suggèrent un rôle des sPLA2 dans l'inflammation du système nerveux. La neuroinflammation est un dénominateur commun de nombreuses pathologies psychiatriques humaines parmi lesquels les troubles anxiodépressifs.

Les objectifs, nous étudierons : 1- si les sPLA2 jouent un rôle dans le développement ou contribuent à l'amélioration de l'état anxiodépressif 2- si les

2- le potentiel thérapeutique des activateurs et/ou inhibiteurs des sPLA2 dans les troubles anxio-dépressifs

Pour atteindre ces objectifs, nous disposons de souris transgéniques n'exprimant pas les sPLA2 d'intérêt. Les capacités d'apprentissage, de mémorisation et le développement de troubles anxiodépressifs des souris transgéniques seront comparés à celui des souris sauvages. Le phénotype de ces souris ne semble pas dommageable. En effet, elles ont été hébergées et reproduites à l'animalerie pendant une dizaine d'années. Aucune différence de durée de vie, poids, prise alimentaire et hydrique, agressivité, aspect du pelage, capacités de reproduction et d'allaitement n'a été notée par rapport à leurs congénères sauvages.

De nombreuses activateurs et/ou inhibiteurs des sPLA2 sont disponibles commercialement. Une partie importante de notre projet consistera à étudier le potentiel thérapeutique de ces molécules dans le contexte de la dépression chez la souris. Il va de soi que ces études précliniques sont indispensables avant toute investigation en santé humaine.

Dans ce projet, la règle des 3 R sera respectée :

- Remplacer : En parallèle des expérimentations sur l'animal, nous effectuons des expériences in cellulo pour tester les effets des sPLA2 sur les différents types cellulaires du cerveau. Entre autre, seront utilisées des lignées neuronales, astrocytaires et microgliales. Cependant, le recours à des souris sera nécessaire pour évaluer l'impact des sPLA2 à l'échelle de l'organisme entier au niveau comportemental, neuro-anatomique et neurochimique.

- 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 taille moyenne avec les tests statistiques adéquats. Les animaux soumis à des tests comportementaux générant peu ou pas d'inconfort (test de mémorisation, d'exploration, d'apprentissage, etc.) seront utilisés afin de collecter des échantillons biologiques. Cette procédure permettra de limiter le nombre total d'animaux. Ce projet sera réalisé sur les souris mâles pour lequel les résultats comportementaux sont statistiquement plus homogènes. Si les résultats s'avèrent intéressants une nouvelle autorisation sera déposée afin de comparer le rôle des sPLA2 en fonction du genre. Un total de 2424 souris (sauvages et transgéniques) est requis pour ce projet réparti comme suit : P1 et P4 200 souris; P2, P3, P5 et P6 120 souris; P7 80 souris; P8 252 souris. Les procédures seront répétées sur une seconde cohorte pour validation.

- Raffiner : Nos conditions d'élevage impliquent un cycle jour /nuit de 12h/12h, une température et hygrométrie contrôlée, alimentation et boisson ad libitum et suivi quotidien des animaux. La stabulation par 5 animaux pour les conditions « standard » (ES) et par 12-15 pour les conditions EE en présence de roues d'exercice, maisonnettes, jouets, hamacs etc. ce qui permet une stimulation sensori-motrice. Les tests comportementaux pourront générer un inconfort faible, modéré ou sévère mais toujours de courte durée (5 à 60 min). Un suivi sous forme de grille de score 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. Des analyses biologiques seront réalisées sur le sang et le LCR des souris ayant subies les tests comportementaux ; ceci permettra de mettre en évidence des corrélations entre performances comportementales et marqueurs biologiques. La collecte du LCR sera réalisée sous anesthésie générale en présence d'analgésiques.

Dernier élément de raffinement notable ; en raison de l'aversion naturelle de la souris pour l'eau nous étudions les capacités mnésiques des souris non pas en utilisant le test de la piscine de Morris (ou water maze), très stressant mais le labyrinthe de Barnes.

9998 L'information génétique, ou ADN, des cellules de l'organisme est fragilisée lors du vieillissement ou d'infections du cerveau. En particulier, il apparaît des cassures affectant les deux brins de la double hélice de l'ADN, qui peuvent entraîner des défauts de lecture de l'information génétique ou des mutations. Dans des cellules qui se divisent, ces altérations sont souvent à l'origine de cancers. Dans les cellules qui ne se divisent pas, comme les neurones, ces altérations semblent associées à des dysfonctionnements neuronaux et à des troubles cognitifs. Elles pourraient notamment contribuer aux désordres neuronaux associés aux infections du cerveau ou aux maladies neurodégénératives, comme la maladie d'Alzheimer ou la sclérose en plaques. Cependant, les conséquences exactes des cassures double-brin de l'ADN sur les processus cognitifs restent mal comprises. Une meilleure compréhension du rôle et les mécanismes de ces cassures dans les neurones revêt donc une importance capitale en recherche fondamentale et médicale. En effet, contrecarrer les dommages de l'ADN dans les neurones pourrait constituer une piste thérapeutique intéressante.

Certains médiateurs de l'inflammation, les cytokines, qui circulent en grande quantité dans le cerveau au cours des infections ou lors des maladies neurodégénératives pourraient perturber les mécanismes de réponses aux cassures des neurones. Identifier quelles cytokines seraient

impliquées dans la réponse aux cassures pourrait permettre de mieux comprendre comment les processus de neuro-inflammation affectent le comportement et la cognition. Ici, il est proposé d'utiliser des modèles de souris dans lesquels il est possible d'induire la suppression de l'expression d'un récepteur à une cytokine à la fois, et cela seulement dans les neurones ou les cellules gliales. Cela permettra d'étudier l'importance de cette cytokine dans l'accumulation des dommages à l'ADN et les troubles comportementaux liés à certaines infections du cerveau ou dans un modèle de la maladie d'Alzheimer.

Le recours à un modèle animal est donc irremplaçable pour cette étude, puisqu'elle vise à déterminer les effets de la suppression de la signalisation de cytokines sur la physiologie de neurones, le comportement et la cognition.

Il est prévu d'utiliser un maximum de 1312 souris sur 5 ans.

La règle des 3R sera appliquée pour ce projet comme suit :

1- Remplacement : le recours à l'expérimentation animale dans le cadre de cette étude intervient après de nombreuses études *in vitro* utilisant des modèles cellulaires qui ont démontré l'impact de l'inflammation sur l'activation des cascades conduisant aux cassures double-brins de l'ADN. Le principe de remplacement n'est pas applicable à ce projet car ces études *in vitro* ne permettent pas d'étudier l'importance des manipulations proposées sur le comportement et la cognition.

2- Réduction : les expériences sont planifiées de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux, tout en permettant une analyse statistique valide des résultats. Des études sur des modèles animaux similaires ont montré que des groupes de 12 animaux par expérience comportementale étaient nécessaires. En outre, un même groupe d'animaux pourra être utilisé pour plusieurs tests comportementaux.

3- Raffinement : Les conditions d'expérimentations font l'objet d'une procédure de suivi du bien-être animal. Les animaux seront suivis quotidiennement dès le début des procédures. Un animal sera euthanasié s'il présente un des points limites d'arrêt de la procédure, que nous aurons définis en accord avec le comité local de suivi du bien-être animal pour limiter la douleur, la souffrance ou l'angoisse de l'animal. Nous nous attendons à ce que les cytokines conduisent à un état fébrile passager. Les animaux seront euthanasiés si nous observons l'un des signes suivants : perte de poids > 20%, état fébrile persistant au-delà de 10 jours.

9999 Ce projet a pour but d'étudier l'un des mécanismes à l'origine de l'apparition d'hémopathies malignes chez l'homme. Les hémopathies malignes sont des affections de la moelle osseuse, tissu qui est responsable de la fabrication de l'ensemble des cellules du sang (globules rouges, globules blancs et plaquettes). Les hémopathies malignes regroupent un ensemble hétérogène de cancers des cellules sanguines ; on distingue les leucémies, les syndromes myélodysplasiques, les syndromes myéloprolifératifs et les lymphomes. Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) représentent la majorité des leucémies aiguës de l'adulte. Comme toutes les hémopathies, les LAM sont la conséquence de nombreuses anomalies génétiques acquises au cours du temps.

Les conséquences fonctionnelles des événements fondateurs du cancer ne peuvent être pleinement appréhendées qu'au sein d'un organisme vivant ; en effet ces anomalies génétiques influent sur l'expression de nombreux gènes qui eux-mêmes conditionnent le devenir des cellules en réponse aux multiples signaux extracellulaires présents chez un individu et au sein d'un tissu (hormones, facteurs de croissance, etc.).

L'utilisation d'animaux est incontournable dans le cadre de la recherche translationnelle, pour évaluer l'utilité des médicaments sur le développement et le maintien de la maladie ; en effet les analyses sur lignées cellulaires établies *in vitro* ne nous donnent que des informations partielles sur les caractéristiques moléculaires et cellulaires des tumeurs et sur l'efficacité des molécules. De plus, les modèles cellulaires établis *in vitro* ne reproduisent pas l'hétérogénéité intra-tumorale définissant la tumeur d'origine du patient. Pour ces raisons, nous utilisons le modèle expérimental de « xénogreffe en souris immunodéficientes de tumeurs de patients » (ou patient-derived tumor xenografts, PDX), plus prédictif de la réalité clinique.

Dans ce projet, nous utiliserons un total de 148 souris pour étudier le maintien et le développement de LAM humaines xénogreffées lors de traitement avec deux molécules présentant un intérêt thérapeutique dans ces pathologies et touchant deux grandes fonctions biologiques généralement

altérées : la prolifération et la différenciation cellulaires. Le nombre d'animaux choisi pour chaque lot représente le minimum requis pour constituer un échantillonnage représentatif et le groupe contrôle sera partagé entre plusieurs groupes expérimentaux. Dans l'objectif de respecter le raffinement, nous limiterons le nombre d'animaux utilisés en ne maintenant les PDX que sur un nombre limité de passages (deux passages) ; ceci permettra également d'avoir une meilleure reproductibilité de l'étude.

Afin de limiter au maximum, l'angoisse et la douleur infligée aux animaux, toutes les interventions invasives seront faites sous anesthésie à l'isoflurane (prélèvements de sang) et nous réaliserons toutes les injections après application d'un anesthésique local (lidocaïne ou assimilé). Les expériences d'imagerie dynamique intravitale non invasives seront faites sous anesthésie à l'isoflurane. Cette technique d'imagerie par bioluminescence est non invasive et permet de suivre la prolifération tumorale en présence ou non d'un agent anticancéreux chez un même animal, permettant ainsi la réduction du nombre d'animaux utilisés. Par ailleurs, il sera possible de définir pour chaque modèle une valeur de bioluminescence comme critère d'arrêt et éviter ainsi à l'animal de souffrir du développement du greffon tumoral. Les points limite seront strictement appliqués. Les animaux bénéficieront d'un environnement enrichi en tout temps. Un complément alimentaire en gel sera ajouté dans les cages en cas de diminution de la prise alimentaire. L'ensemble du personnel impliqué dans ce projet est formé aux procédures expérimentales sur animaux. Les résultats obtenus in vivo devraient permettre d'asseoir le développement de ces outils thérapeutiques.

10000 En cancérologie, l'efficacité des traitements médicaux varie en fonction de l'hétérogénéité de la tumeur et de la compréhension, très incomplète à l'heure actuelle, des mécanismes d'action et de résistance aux médicaments. La plupart des études conduisant à des développements cliniques ont été menées sur des lignées cellulaires et des modèles in vivo datés et non représentatifs de cette hétérogénéité. Cette différence, entre les modèles utilisés en phases précoces de développement et les cancers rencontrés en situation clinique, rallonge les délais de mise sur le marché des médicaments et augmente leurs coûts de production, déjà très élevés. En conséquence, seuls 10% des molécules entrant en phase I en oncologie feront l'objet d'une demande d'enregistrement auprès des autorités régulatrices. L'établissement de modèles in vivo reproduisant au mieux la diversité des cancers humains est aujourd'hui un enjeu majeur afin de développer des thérapies anti-cancéreuses plus diverses, adaptées au besoin des patients et moins coûteuses.

Les greffes de tumeurs humaines de patients sur souris sont les modèles qui, à l'heure actuelle, permettent au mieux de récapituler les caractéristiques des cancers humains en reproduisant toutes les étapes et aspects de la pathologie. Les résultats obtenus dans les PDX déjà développés montrent une réelle corrélation avec les réponses cliniques obtenus chez les patients.

L'objectif de ce projet est d'établir un panel de PDX représentant la diversité des cancers existants et utilisables comme modèles précliniques fiables par les chercheurs, les médecins et les entreprises du médicament. Cette collection de PDX constituera une base d'outils puissants permettant d'améliorer de façon significative le champ des innovations thérapeutiques en oncologie. Notre intention est d'établir 120 nouveaux modèles de tumeurs humaines capables de se développer sur souris pendant 2 ans. Soit 40 par implantation de cellules tumorales circulantes (obtenues à partir de prélèvements sanguins) ou de fragments de tumeurs de patients, et 80 par transfert de modèles primo-implantés par des équipes académiques. L'établissement de ces modèles se fera dans le respect des lois en vigueur après obtention du consentement éclairé des malades. Le nombre de souris utilisé dans ce projet se justifie par un processus de développement exigeant et nécessaire pour établir une collection de modèles fiables et utilisables comme modèles précliniques.

Nous prévoyons d'utiliser un maximum de 8976 souris.

Dans le respect de la règle des 3 R,

1) Ces modèles sont les seuls permettant de reconstituer sur l'animal la complexité des tumeurs humaines, et bien que l'environnement cellulaire qui entoure les greffons est constitué de cellules/tissus de souris, ce sont sans doute les modèles qui s'approchent le plus de la maladie humaine.

2) Pour chaque modèle obtenu, des lignées cellulaires seront dérivées. Des explorations fonctionnelles liées aux éventuels mécanismes de résistance et des tests pharmacologiques seront réalisées sur ces lignées. Les résultats ainsi obtenus permettront de sélectionner les drogues à tester in vivo et ainsi de Réduire le nombre d'animaux utilisés ultérieurement dans les évaluations précliniques de ces drogues. Par ailleurs, le développement et la mise à disposition d'une large collection de PDX permettront une meilleure évaluation des médicaments antitumoraux testés en préclinique, entraînant également une réduction du nombre d'animaux utilisés dans les études futures.

3) Les animaux seront hébergés en petits effectifs par cage et manipulés dans des conditions d'hygiène rigoureuses afin de garantir un statut sanitaire optimal. Dans chaque cage, les animaux recevront un enrichissement de milieu (carré de coton). Les animaux seront anesthésiés lors de toute greffe. En cas de castration préalable à la greffe de cancer de la prostate, celle-ci sera réalisée sous anesthésie générale profonde et les animaux recevront un analgésique dans l'eau de boisson en pré- et post-opératoire. L'état physique et le comportement des animaux seront contrôlés quotidiennement.

10001 Les modifications du métabolisme cellulaire des cellules de l'immunité innée ont récemment émergé comme un aspect essentiel à l'activation de ces cellules et à la mise en place d'une réponse antimicrobienne spécifique. Dans ce contexte, la mitochondrie, l'organelle bioénergétique de la cellule, joue un rôle fondamental car elle représente à la fois l'unité bioénergétique principale et une plateforme pour la signalisation des récepteurs de l'immunité innée chargés d'initier ces réponses immunitaires. Ainsi, les patients souffrant de maladies mitochondriales semblent plus sensibles face aux infections bactériennes. Notre projet de recherche s'attache à caractériser les fonctions mitochondriales essentielles à la mise en place des réponses immunitaires antibactériennes par les cellules de l'immunité innée. Nous nous attachons particulièrement à déterminer les fonctions immunes du métabolisme mitochondrial. Pour cela nous nous appuyons sur l'utilisation de souris transgéniques déficientes pour différentes protéines de la mitochondrie, mimant ainsi les dysfonctionnements rencontrés chez certains patients. Nous évaluons la sensibilité de ces animaux face à différentes infections bactériennes, caractérisons les réponses immunitaires générées et déterminons les adaptations du métabolisme cellulaire engendrées. La réponse immunitaire fait appel à une très grande variété de cellules immunitaires qui interagissent entre elles et avec les pathogènes. Il n'existe donc pas de modèle in vitro permettant d'évaluer globalement ces processus. Ces études permettront d'identifier des cibles potentielles pour le traitement des maladies mitochondriales et le développement de vaccins.

Nous demandons pour réaliser l'ensemble de nos expériences 228 animaux. Dans le respect de la règle des 3R, nous combinerons nos lots témoins dans le but de restreindre le nombre d'animaux. Nous procéderons également à une sélection in vitro des souches bactériennes à utiliser et, le cas échéant, reconsidérerons à la baisse les lots d'animaux requis. Afin de respecter la notion de raffinement, le bien-être de nos animaux sera pris en compte de leurs naissances à leurs morts. Chaque cage de type 2L reçoit un enrichissement (des nids) permettant un bon raffinement des conditions d'hébergement. L'estimation de la souffrance est réalisée quotidiennement par le personnel de l'animalerie. Un scoring est réalisé. Au-delà du seuil défini, l'animal sera euthanasie sans attendre et éliminer de l'étude. ^L_{SÉP}

10002 La dermatite atopique est une maladie de la peau pouvant être associée à d'autres affections telles que l'asthme ou la rhinite allergique. La dermatite atopique, caractérisée par des démangeaisons et de l'eczéma, affecte 10% à 20% des enfants et 1% à 3% des adultes. Les patients présentent des dysfonctionnements de la barrière cutanée conduisant à une inflammation de la peau.

Nous avons développé dans notre laboratoire un modèle de souris mimant les caractéristiques de la dermatite atopique. Dans ce modèle, une altération de la barrière cutanée est obtenue par la mutation d'un gène codant pour une protéine nécessaire à l'établissement de cette barrière. Cela va générer des symptômes présentant différentes caractéristiques propres à la dermatite atopique. L'étude de ce modèle nous a permis d'identifier plusieurs cibles thérapeutiques qui pourraient permettre de développer des stratégies de préventions efficaces et de traiter la dermatite atopique.

En collaboration avec une société pharmaceutique, nous souhaitons utiliser notre modèle pour tester deux candidats médicaments. Ceux-ci ont été sélectionnés après des études *in vitro* et pourraient permettre de bloquer la progression vers la dermatite atopique après la rupture de la barrière cutanée.

Chaque candidat fera l'objet d'une étude spécifique. Les animaux seront observés régulièrement afin de déterminer leur "score dermatite atopique" (SCORAD) tel que pratiqué chez les patients (rougeur de la peau, épaisseur, gonflement, encroutement, égratignures). Les tissus impliqués dans la dermatite atopique, la peau et les ganglions lymphatiques, seront analysés pour évaluer la réponse immunitaire.

Remplacement : Les phénomènes à l'œuvre dans ces réactions immunitaires mettent en jeu différents organes et plusieurs types cellulaires. Cette complexité rend nécessaire l'utilisation d'expériences *in vivo* pour comprendre cette réponse inflammatoire. Grâce aux techniques de génie génétique, il nous a été possible de créer un modèle murin de dermatite atopique très similaire à la pathologie humaine. Les candidats médicaments ont prouvé leur efficacité *in vitro* et il est maintenant indispensable d'effectuer des tests *in vivo* chez l'animal avant de poursuivre éventuellement par des tests chez l'être humain.

Réduction : Ce protocole sera appliqué à 7 groupes de 10 souris pour un total de 70 animaux. L'effectif de 10 animaux par groupe est l'effectif minimal qui nous permettra d'avoir des résultats statistiquement interprétables pour les différentes phases de la réponse immunitaire étudiée et pour les différents paramètres mesurés.

Raffinement : Les animaux seront suivis au minimum tous les quatre jours. D'après notre expérience, 3 semaines après la rupture de la barrière cutanée le phénotype reste modéré et est caractérisé par un eczéma observé au niveau des oreilles, du museau et du cou des animaux. Néanmoins si un animal présente un dos voûté, un pelage hérissé ou est inactif après stimulation, il sera retiré de l'étude et pourra bénéficier de soins après l'avis du vétérinaire. Si le cas est plus grave (blessure importante par exemple), l'animal sera euthanasié immédiatement.

10003 Les leucémies aigües lymphoblastiques B (LAL-B) sont des cancers affectant certaines cellules du système immunitaire : les lymphocytes B. Elles peuvent être classées en plusieurs types, notamment en fonction des anomalies génétiques qu'elles portent. La nature de ces anomalies est étroitement liée à l'agressivité de la leucémie.

Cependant, peu de choses sont connues concernant la cellule d'origine et le stade développemental d'où émergent ces leucémies.

Les lymphocytes B sont divisés en 2 types cellulaires distincts : les lymphocytes B1 et B2. Les lymphocytes B2 correspondent à la majorité des lymphocytes B présents chez l'adulte. Les lymphocytes B1 sont quant à eux d'origine fœtale et sont beaucoup plus rares. A ce jour, l'identité B1 ou B2 des LAL-B est inconnu.

Notre équipe a identifié le facteur de transcription Ikaros comme étant un régulateur négatif du développement des lymphocytes B1. Cette observation est intéressante car le gène IKZF1, codant pour Ikaros, est souvent perdu dans les LAL-B. De nombreuses études ont montré que cette anomalie génétique est souvent présente dans les leucémies de mauvais pronostic.

Notre objectif est de comprendre le rôle d'Ikaros dans le développement des lymphocytes B1 et de déterminer si la perte d'Ikaros est à l'origine de LAL-B de type B1. Pour cela, nous analyserons les effets de la perte d'Ikaros dans des cellules B1 leucémiques murines (exprimant différents oncogènes tels que BCR-ABL, ETV6-RUNX1 et MLL-AF9) après injection de ces cellules leucémiques à des souris.

Remplacement : Cette analyse *in vivo* est nécessaire pour déterminer le rôle d'Ikaros dans les LAL-B. Le remplacement par des techniques *in vitro* n'est plus possible à ce stade du projet.

Nous espérons que les résultats de toutes ces expériences permettront d'identifier des voies moléculaires qui pourront être ciblées pour des approches thérapeutiques.

REDUCTION : Toutes les expériences sont réalisées en groupe et répétées 2 à 3 fois. Si les résultats obtenus sont significatifs après 2 expériences nous n'effectuerons pas de troisième expérience de transplantation. Nous utiliserons 216 souris pour l'ensemble de ce projet (de 3 à 12

par groupe selon les procédures), cet effectif permettant une conclusion basée sur des tests statistiques.

Raffinement : afin de respecter au mieux le bien-être des animaux, ces derniers seront suivis de près et des points limites seront établis (comme l'atteinte d'une anémie trop importante par exemple) pour réduire au minimum toute souffrance chez nos souris.

10004 Des études ont maintenant démontré que l'alimentation peut remarquablement affecter l'apparition du cancer et sa progression. Parmi les divers facteurs connus comme pouvant jouer un rôle important, des niveaux élevés de cholestérol alimentaire ou plasmatique sont maintenant reconnus comme des facteurs de risque potentiellement importants pouvant favoriser le développement de la tumeur, en particulier dans le cas du cancer du sein. Les études proposées permettront une meilleure compréhension de la relation entre le métabolisme du cholestérol et l'apparition et la progression du cancer du sein. Ce projet nous donnera aussi l'occasion de développer de nouvelles approches thérapeutiques basées sur le métabolisme du cholestérol pour le traitement du cancer. Il est important de noter qu'il n'y a pas de modèle in vitro capable de modéliser le cancer. 222 souris seront utilisées dans ce projet. Ce nombre représente le nombre minimum d'animaux requis pour observer des différences significatives entre les différents groupes expérimentaux. Le développement des tumeurs sera limité et les animaux portant des tumeurs seront particulièrement suivis afin d'éviter toute souffrance. Dans tous les cas, les animaux portant des tumeurs seront particulièrement suivis. Lorsque nécessaire, les souris seront placées sous anesthésie générale (si besoin sur tapis chauffant) pour limiter la douleur.

10005 Les maladies neurodégénératives dont la maladie d'Alzheimer, d'Huntington, les ataxies spinocérébelleuses (SCA) et la sclérose latérale amyotrophique sont une préoccupation croissante en santé publique. Malgré d'importants efforts de recherche, il n'existe encore aucun traitement capable de combattre de façon efficace la progression de ces maladies.

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

L'objectif de ce projet est d'une part, de valider l'approche d'injection intracérébrale qui sera utilisée chez les patients à l'aide d'un agent de contraste et dans le but de réduire et raffiner nos expériences, les primates seront ensuite pour évaluer la faisabilité et l'efficacité de l'administration par thérapie génique à l'aide d'un vecteur Adéno associé (AAV) en voie intraveineuse.

Nous avons déjà validé le vecteur par injection intraveineuse chez la souris et l'étape primate non-humain (NHP) est cruciale en vue de valider la biodistribution du vecteur dans le système nerveux central et les organes périphériques avant d'envisager les étapes cliniques.

Le PNH est fondamental pour approcher les obstacles de l'administration de volumes importants de vecteur et du ciblage d'organes de taille semblables à celles de l'homme. Le choix de l'espèce est basé sur son homologie avec l'homme, au niveau des plans anatomiques et fonctionnels du Système Nerveux Central (SNC) et du point de vue immunitaire (tolérance semblable).

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

Tous les animaux seront nés et élevés en captivité dans des élevages agréés. Le présent projet limitera le nombre d'animaux au strict minimum (10 PNH), et veillera à ce qu'ils ne souffrent ni des

procédures d'administration des vecteurs AAV, ni de la présence d'AAVs dans leurs organes. Des examens cliniques journaliers et l'application de critères d'arrêt de protocole permettront de veiller au bien-être des animaux.

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

Enfin l'administration de vecteur se fera par voie intraveineuse qui est non invasive et non douloureuse pour l'animal.

10006 Le remodelage du tissu cardiaque est systématique au cours des cardiopathies comme l'insuffisance cardiaque qui est une maladie fréquente (environ 500 000 personnes en France) de mauvais pronostic (50% de décès dans les 5 ans suivant le diagnostic) et un facteur de risque de mort subite par troubles du rythme. Les troubles du rythme sont en général imputés au développement de la fibrose cardiaque mais des données récentes suggèrent que la désorganisation de l'architecture des cellules contractiles pourrait aussi jouer un rôle clé. Dans un modèle de souris transgénique présentant une désorganisation architecturale du tissu cardiaque sans fibrose, il a été observé une susceptibilité particulière à différents stress et un taux élevé de mort subite probablement lié à des troubles du rythme.

Le projet vise donc à étudier dans ce modèle et chez des souris contrôles, l'effet sur l'électrocardiogramme (ECG) de médicaments utilisés chez l'Homme et connus pour leurs effets inducteurs de troubles du rythme. Dans une première étape, pour chaque produit, une dose unique choisie en fonction des données de la littérature sera administrée par voie intrapéritonéale chez 20 souris (10 souris transgéniques et 10 contrôles) pendant l'enregistrement de l'ECG. Cinq produits, agissant sur des cibles différentes au niveau des cellules cardiaques (canaux ioniques ou récepteurs) contrôlant le rythme cardiaque seront étudiés. Dans une deuxième étape, pour chacun des produits ayant induit des modifications significatives de l'ECG ou des troubles du rythme, une étude de la relation entre la dose administrée et l'effet sera réalisée chez 20 souris supplémentaires (10 souris transgéniques et 10 contrôles).

La règle des 3R sera appliquée dans ce projet :

-Remplacement : Il n'existe pas de moyen alternatif pour l'étude de l'impact de la désorganisation de l'architecture du tissu cardiaque dans la survenue de troubles du rythme. Ceux-ci dépendent en effet, non seulement des caractéristiques du tissu cardiaque mais également de l'influence de facteurs nerveux et hormonaux qui imposent donc le recours à l'animal.

-Réduction : L'organisation de l'expérience permet de réduire au maximum le nombre d'animaux. Ainsi, la taille des cohortes (au maximum 10 cohortes d'animaux transgéniques) a été déterminée afin d'obtenir des résultats statistiquement exploitables. Pour la première étape, les souris (transgéniques et contrôles) recevront chacune 2 produits différents sauf pour une cohorte en raison de la demi-vie du produit testé (60 animaux). Le nombre total d'animaux utilisés dans ce projet variera entre 60 et 160 en fonction du nombre de produits pour lesquels la deuxième étape du projet sera nécessaire.

-Raffinement : les animaux seront acclimatés avant le démarrage du projet. Les animaux seront hébergés en groupe et des enrichissements (coton, cellulose bûchettes) seront introduits dans la cage afin de favoriser les comportements naturels et diminuer l'agressivité. L'enregistrement de l'ECG et l'administration des molécules seront réalisés sous anesthésie générale. Tout au long de l'expérimentation, une procédure de suivi quotidien du bien-être des animaux, adaptée à l'expérience et à l'évaluation des potentiels effets indésirables liés procédures sera mise en place.

10007 Une des caractéristiques liées à l'obésité est l'augmentation des graisses dans la circulation sanguine. Les graisses sont stockées de manière très importante dans le tissu adipeux où elles sont dégradées en acides gras ce qui permet 1/ la production de chaleur, 2/ la libération des acides gras dans la circulation sanguine qui sont ensuite consommés par les autres cellules de l'organisme,

notamment le foie, à des fins énergétiques. Ainsi un défaut de combustion et/ou de consommation de ces graisses par les tissus périphériques conduit à une augmentation des graisses dans le sang et à une mauvaise thermorégulation. La compréhension des mécanismes de consommation de ces graisses représente donc un enjeu important.

Nous étudierons le rôle d'une protéine impliquée dans la dégradation de ces graisses au niveau du foie, un organe central dans l'homéostasie énergétique. Pour cela, nous utiliserons des souris génétiquement modifiées qui n'expriment pas cette protéine uniquement dans le foie.

Dans un premier temps, nous traiterons des souris avec une molécule pharmacologique qui induit la libération d'acides gras du tissu adipeux vers la circulation conduisant à l'augmentation des graisses circulantes.

Nous mesurerons les conséquences de cette accumulation de graisses en terme d'expression du génome et de sécrétion d'hormones hépatiques. Le rôle de la protéine d'intérêt au niveau du foie sera évalué grâce à un modèle de souris dont le gène codant pour cette protéine a été spécifiquement invalidé dans le foie. Nous réaliserons ces expériences sur 4 lots de souris : 2 lots de 8 souris qui ne possèdent pas la protéine au niveau du foie et qui sont traitées ou non avec la molécule pharmacologique, et 2 lots de 8 souris de type sauvage, traitées ou non avec la molécule pharmacologique.

Dans une deuxième série d'expérience, les animaux seront exposés au froid (4°C) pendant 5h entraînant comme précédemment une libération d'acides gras du tissu adipeux vers la circulation mais aussi une production de chaleur. Nous comparerons la thermorégulation chez des souris de type sauvage et des souris qui ne possèdent pas la protéine au niveau du foie. Nous réaliserons ces expériences sur 4 lots de souris : 2 lots de 8 souris qui ne possèdent pas la protéine au niveau du foie et qui sont exposées ou non au froid, et 2 lots de 8 souris de type sauvage, exposées ou non au froid.

En fin de protocole, une prise de sang sera effectuée pour doser les lipides circulants et divers paramètres sanguins. Immédiatement après, les animaux seront euthanasiés et des organes (foie, tissu adipeux blanc et tissu adipeux brun) leur seront prélevés afin de conduire des études d'expression de gènes impliqués dans les voies métaboliques. Cette expérience permettra :

- de mettre en évidence l'implication d'une protéine du foie dans la prise en charge des graisses provenant du tissu adipeux et dans le processus de thermorégulation.
- d'étudier le dialogue entre différents organes : le foie et les tissus adipeux.

L'utilisation de l'animal entier est indispensable car le projet porte sur le dialogue entre plusieurs organes dans la régulation des voies métaboliques. La souris est un modèle de choix pour nos expériences car adapté aux mécanismes que nous étudions et qui nous permet d'invalider une protéine d'intérêt dans un organe en particulier. Pour ces expériences, nous utiliserons donc au total 64 animaux. Ceci nous permet de travailler sur des lots de 8 souris par condition, nombre d'animaux minimum nécessaire afin d'obtenir des résultats exploitables. Nous veillerons au bien-être des animaux tout au long des expérimentations en leur assurant les meilleures conditions d'hébergement, dans un environnement contrôlé et une surveillance par le personnel soignant. Ces deux procédures (une injection d'agoniste beta3-adrénergique et exposition à 4°C pendant 5h) entraînent peu de souffrance chez l'animal et permettent d'éviter l'utilisation d'un régime restrictif sur le long terme qui entraînerait une chute de poids importante chez les animaux pour mimer les mêmes effets. Lors de l'exposition au froid, la température corporelle des animaux sera mesurée toutes les heures et si un animal présente une hypothermie sévère (température corporelle inférieure à 30 degrés) il sera aussitôt éliminé de la procédure et réchauffé (lampe chauffante).

10008 Les lymphomes de cellules B représentent en France le 6e type de cancer le plus fréquent avec plus de 3,5% des cas de cancers. Des avancées dans les traitements en chimiothérapies ont amélioré la survie et les conditions de vie des patients affectés par ces lymphomes, mais entre 40% et 60% des personnes diagnostiqués avec un lymphome de cellules B résistent ou rechutent après le traitement anti-cancéreux. Des nombreuses évidences ont montré que les bactéries intestinales, qui constituent le microbiote, influencent la réponse à la chimiothérapie dans le cas des tumeurs solides. Par contre, il reste peu clair si le microbiote influence le développement des lymphomes des cellules B et leur réponse à la chimiothérapie. De plus, le microbiote intestinal joue aussi un

rôle clé dans les pathologies métaboliques telles que l'obésité et le diabète de type 2. De façon intéressante, il a été mis en évidence que les infections de certains types de bactéries intestinales comme les entérobactéries, qui colonisent le tractus des nouveau-nés dès les premières heures après la naissance, augmentent au cours de ces pathologies métaboliques. Ces souches, transmises par la mère, sont des bactéries commensales qui persistent dans le tractus intestinal toute la vie de l'individu. Cependant, certaines souches d'entérobactéries sont aussi pathogènes, responsables de diarrhées, méningites, etc. et on les retrouve associées à des maladies inflammatoire chronique de l'intestin. Certaines de ces souches pathogènes produisent des toxines dites génotoxines qui provoquent des dommages à l'ADN dans les cellules intestinales. On retrouve aussi des souches commensales exprimant cette génotoxine dans 25% de la population générale, ainsi qu'une souche probiotique. Pour comprendre le rôle de ces souches et de l'influence des pathologies métaboliques dans le développement tumoral et dans la résistance à la chimiothérapie, nous comptons utiliser un modèle murin très bien établi : des cellules contenant la translocation d'un gène pro-tumoral sont injectées dans des souris sauvages nourries par un régime normal, ou les tumeurs se développent entre 6 et 21 jours. Un traitement de chimiothérapie permet en 2 jours d'éradiquer les tumeurs qui après se développent à nouveau sous 3 semaines. Pour répondre aux questions ci-dessus, outre les souris sauvages nourries par un régime normal, nous allons étudier le développement tumoral et la résistance à la chimiothérapie chez deux autres modèles de souris : 1- des souris sauvages infectées au préalable avec des bactéries intestinales commensales ou pathogènes, soit avec des pathogènes atténués soit avec des souches probiotiques ; 2- des souris sauvages rendues obèses et diabétiques par voie nutritionnelle (régime normal ou gras, pour développer le modèle de maladie métabolique); 3- des souris rendues obèses et diabétiques par voie génétique. Suite au développement des tumeurs, nous effectuerons un traitement de chimiothérapie et par la suite nous évaluerons la résistance à la chimiothérapie en mesurant le temps nécessaire pour la réapparition des tumeurs et si cela est affecté par les infections à entérobactéries et/ou par le régime gras.

Ce projet nous permettra de mieux comprendre l'influence du microbiote et des altérations liées aux maladies métaboliques et aux infections à entérobactéries dans le développement de la résistance à la chimiothérapie au cours du traitement des lymphomes de cellules B. Ce projet pourrait aussi permettre le développement de stratégies pour cibler le microbiote chez des patients affectés par les lymphomes de cellules B et de leur proposer des traitements complémentaires. Nous comptons utiliser un total de 840 souris mâles (*Mus musculus*) de fond génétique C57Bl/6J âgées de 7-8 semaines au début du projet. Ces souris seront colonisées soit avec des bactéries commensales, soit pathogènes, soit avec des pathogènes atténués soit avec des souches probiotiques. Ensuite, les souris seront nourries avec soit un régime normal ou gras, pour développer le modèle de maladie métabolique et certains groupes de souris seront injectés avec des cellules tumorales.

Dix animaux par groupes seront utilisés. Ce chiffre nous permettra d'attendre un seuil statistiquement valable pour interpréter les résultats obtenus. Cela nous permettra le respect de la règle de 3R (remplacer, réduire, raffiner) car :

- certaines expérimentations seront conduites in vitro pour mieux disséquer les mécanismes moléculaires identifiés chez la souris (remplacer).
- les expérimentations ne seront pas répétées de façon systématique, tout en respectant la réduction du nombre d'animaux employés (réduire).
- les procédures d'infection par les bactéries n'ont pas été rapportées pour induire de la douleur chez l'animal et sont bien tolérées avec les souches bactériennes qu'on compte utiliser. Néanmoins, une perte ou une hausse (non attendues) du poids corporel initial supérieure à 20% nous conduira à sortir l'animal du protocole expérimental et à l'euthanasier (raffiner).

10009 L'incidence des maladies en lien avec le microbiote telles que les maladies métaboliques (obésité, diabète de type 2 et stéatose hépatique) et les maladies inflammatoires de l'intestin a augmenté ces 30 dernières années. De nombreuses études appuient l'hypothèse que l'exposition à des contaminants environnementaux, tels que les pesticides, est un facteur de risque au développement de ces pathologies, notamment dans des conditions de déséquilibre alimentaire ou non. La période périnatale est particulièrement sensible, et l'exposition à des polluants au cours de cette période

pourrait être particulièrement néfaste pour le métabolisme à l'âge adulte. De plus, c'est lors de cette période que se met en place le microbiote intestinal, qui joue un rôle majeur dans l'immunité et le métabolisme.

Ce projet vise à étudier l'impact de contaminants alimentaires pertinents pour l'exposition des consommateurs européens, à des doses pertinentes pour l'évaluation du risque (dose journalière tolérées), avec une voie d'exposition réaliste (alimentaire), en période critique (périnatale) et sur le long terme, sur les perturbations métaboliques et inflammatoires de l'intestin. L'interaction de ces pesticides avec le microbiote intestinal et les conséquences sur les dérégulations métaboliques seront étudiées.

Pour ce faire, nous utiliserons un modèle animal murin, plus petit modèle disponible. Les mères seront exposées à des pesticides seuls ou en mélange incorporés dans l'aliment au cours de la gestation et la lactation. Un suivi des paramètres métaboliques sera effectué sur les descendant après sevrage par la pesée hebdomadaire des animaux, par la récupération des urines et des fèces, et par le suivi de leur glycémie (en appliquant une méthode identique à celle effectuée chez l'homme i.e. dosage du glucose sur une goutte de sang prélevée à la queue). Ces mesures seront effectuées à trois reprises sur une période de 24 semaines. Des prélèvements de tissus seront effectués post-mortem et analysés par différentes techniques afin d'évaluer l'impact sur le métabolisme et le microbiote. Cette expérimentation mimant l'exposition alimentaire humaine n'entraîne pas de contraintes particulières pour l'animal de laboratoire.

Ce projet a donc pour objectif de comprendre le rôle des contaminants alimentaires dans le développement des maladies métaboliques. Il a été conçu dans son intégralité autour du principe des 3R. L'utilisation de l'animal entier est nécessaire car le projet s'intéresse au métabolisme qui implique le dialogue de nombreux organes entre eux (foie, pancréas, intestin, tissu adipeux et muscle). Il nécessite l'utilisation de 3 fois 1250 souris de laboratoire (total 3750) sur 5 ans pour 3 études concernant respectivement 3 génotypes différents : ce nombre d'animaux a été calculé au plus juste minimum permettant d'assurer la robustesse de l'analyse statistique des résultats obtenus au cours des différentes études. Les souris sont hébergées dans une animalerie conventionnelle dans un environnement contrôlé leur assurant les meilleures conditions de bien-être et de santé. Leur hébergement est enrichi d'un abri en aluminium, ainsi que de papier essuie-tout découpé comme complément de nidification. L'enrichissement décrit sera appliqué aux souris issues de l'élevage et aussi durant les phases d'expérimentation. Le protocole n'induisant que peu de souffrance, un animal dont l'état serait préoccupant (détection d'une souffrance, amaigrissement etc.) serait retiré de l'étude et serait confié au personnel soignant et/ou vétérinaire pour des soins adaptés ou une éventuelle euthanasie.

10010 La diversification des cibles des médicaments anticancéreux et leur meilleure efficacité s'accompagnent d'une augmentation de la survie des patients. Cependant, la rançon de ce succès est l'émergence de nouveaux effets indésirables, parfois de survenue tardive après le traitement, parmi lesquels figurent la cardiotoxicité et le risque d'insuffisance cardiaque.

Les médicaments de la famille des anthracyclines sont des anticancéreux dont la cardiotoxicité est connue depuis longtemps. Si le mécanisme de leur toxicité cardiaque reste encore controversé, le risque d'insuffisance cardiaque limite la dose cumulée maximale administrable à l'Homme. Un autre point en suspens, pour lequel il n'y pas à ce jour d'explication scientifique, est la grande susceptibilité des enfants aux effets indésirables cardiaques de ces anticancéreux.

Afin de vérifier l'hypothèse selon laquelle la susceptibilité des enfants est liée à l'immaturation du tissu cardiaque, deux groupes de 28 souriceaux seront traités ou non pendant 5 semaines par une anthracycline à partir du 7ème jour après la naissance. A l'issue du traitement sera réalisée une étude de la fonction cardiaque in vivo (échocardiographie réalisée sous anesthésie par isoflurane) avant euthanasie de 18 animaux de chaque groupe. Les souriceaux gardés en vie subiront une échocardiographie périodique jusqu'à l'installation d'une insuffisance cardiaque. Si au terme de l'expérience, une différence est observée entre les souris traitées ou non, 2 groupes supplémentaires de 18 animaux seront inclus et euthanasiés après 3 semaines de traitement.

La règle des 3R sera appliquée dans le cadre de ce projet :

- Remplacement : Il n'existe pas à l'heure actuelle de moyen alternatif à l'animal pour l'étude des mécanismes cardiotoxiques de la doxorubicine.

-Réduction : L'expérience a été organisée de manière afin de réduire au maximum le nombre d'animaux. Le nombre maximal d'animaux utilisés pour ce projet sera de 92 souris (2 groupes de 28 animaux et 2 groupes de 18 animaux) et 15 souris adultes (10 femelles et 5 mâles) utilisés comme géniteurs. 107 animaux au total seront donc nécessaires pour mener à bien ce projet.

-Raffinement : les animaux seront acclimatés avant le démarrage du projet. Les animaux seront hébergés en groupe et des enrichissements (coton, cellulose bûchettes) seront introduits dans la cage afin de favoriser les comportements naturels et diminuer l'agressivité. L'échocardiographie sera réalisée sous anesthésie générale. Tout au long de l'expérimentation, une procédure de suivi quotidien du bien-être des animaux, adaptée à l'expérience et à l'évaluation des potentiels effets indésirables liés aux procédures et aux potentiels effets indésirables de la doxorubicine sera mise en place. Les points limites sont définis ci-dessous conduisant à l'arrêt sont : signes de choc persistants après l'injection (salivation, plaques d'urticaire, prurit, tremblements), perte d'appétit et/ou une diminution de la consommation d'eau entraînant une déshydratation, perte de poids supérieure à 20% du poids initial, posture de prostration ou léthargie au-delà de 24 heures après l'injection, difficulté respiratoire prolongée. En cas de dépassement d'un point limite, les animaux seront euthanasiés selon la méthode prévue décrite au protocole.

10011 Projet : La cholangite sclérosante primitive (CSP) est une maladie biliaire fibrosante pour laquelle il n'existe actuellement aucun traitement médical. Dans ce contexte, le récepteur nucléaire de la vitamine D (VDR) a émergé comme une cible thérapeutique potentielle. Afin d'évaluer l'implication du VDR dans la CSP, nous avons développé un nouveau modèle animal en invalidant Vdr dans le principal modèle animal de CSP (la souris Abcb4^{-/-}). Comme attendu, nous avons constaté que l'absence du VDR entraîne une aggravation du phénotype CSP dans ce modèle reconnu et bien documenté de CSP.

L'objectif de notre projet est d'identifier les mécanismes moléculaires et cellulaires responsables de cette aggravation. Le projet permettra de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques mis en jeu dans la CSP et de mieux définir la place de VDR comme cible thérapeutique dans cette maladie.

La CSP faisant appel à l'interaction de différents tissus exprimant VDR, l'implication de VDR dans cette pathologie ne pouvait être abordée que par l'analyse d'animaux invalidés génétiquement pour VDR.

Type d'animaux : Modèles de souris transgéniques invalidés pour différents gènes impliqués dans la CSP.

Nombre d'animaux : Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 278 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 dans la CSP.

Réduction : Nous limitons au maximum le nombre d'animaux par groupe de façon à obtenir des résultats statistiquement fiables. A cause des variabilités inter-animales et intergroupes, un nombre trop restreint d'animaux engendrerait des résultats trop variables et non valides. Compte tenu des données de la littérature (variabilité attendue) et des effets espérés, un test de puissance statistique a été utilisé pour déterminer le nombre minimum d'animaux nécessaire pour cette étude.

Raffinement : Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des procédures ont été mise au point afin de permettre une interprétation fiable dans le respect du bien-être animal, en limitant la douleur et le stress (anesthésie, analgésie, etc.). Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation, les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum. Le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification ou de maison de type igloo. Nous nous efforçons à chaque instant de raffiner

nos procédures afin de garantir le bien-être des animaux en cours de procédure grâce à une surveillance attentive (point limite) et des soins adaptés.

10012 La résistance à l'insuline est un trait caractéristique du diabète de type 2 (DT2) et joue un rôle majeur dans la pathogénèse de la maladie. Dans des situations de pléthore lipidique chronique (obésité), les acides gras s'accumulent dans les muscles où une partie est métabolisée sous forme de dérivés lipidiques spécifiques. Le but de ce projet est de mettre en évidence la fonction de certains de ces dérivés lipidiques dans l'établissement de l'insulinorésistance et du diabète de type 2. Nous avons récemment mis en évidence l'action délétère de certains lipides de certaines classes lipidiques comme les céramides dans la progression de l'insulinorésistance et du DT2. Le but de ce projet sera d'empêcher ces céramides de s'accumuler dans des tissus cibles de l'insulinorésistance comme le foie et les muscles squelettiques en les transformant en d'autres dérivés lipidiques moins délétères. Nous avons choisi d'utiliser la souris comme modèle métabolique intégrée. Ce modèle est le seul disponible actuellement et permet de reproduire facilement des situations physiopathologiques normalement observées chez l'homme.

Ce projet prévoit d'utiliser 276 souris sur 3 ans. Cet effectif est nécessaire pour obtenir des résultats homogènes lors de tests métaboliques pratiqués dans ce projet. Il est à noter que nous réutilisons les mêmes souris pour plusieurs procédures, réduisant ainsi le nombre total d'animaux euthanasiés. Le bien-être des animaux est au cœur de nos préoccupations. Ainsi, des protocoles d'enrichissement de l'environnement de l'animal seront mis en place avec notamment la présence de nids végétaux. Notre projet comportant l'utilisation d'animaux génétiquement modifiés, une attention très particulière sera portée à ces animaux afin de déceler tout comportement anormal. Enfin, l'euthanasie des animaux sera réalisée sur des animaux préalablement anesthésiés.

10013 Le foie est un organe vital qui permet le maintien de l'homéostasie de l'organisme. Il est le siège de maladies qui sont provoquées majoritairement par des virus, des toxiques, des expositions régulières à l'alcool. L'augmentation croissante de l'obésité liée à une alimentation riche en sucres et en graisses associée à la sédentarité contribue au développement de maladies du foie. En effet, une alimentation riche en graisses et hydrates de carbone favorise le développement d'une maladie stéatosique non alcoolique du foie ou Non-Alcoholic Fatty Liver (NAFL). Elle peut évoluer sous une forme plus grave appelée stéato-hépatite ou Non-Alcoholic SteatoHepatitis (NASH), caractérisée par une inflammation du tissu hépatique, qui provoque des dommages et favorise l'apparition d'une cirrhose et plus tardivement l'émergence d'un cancer du foie (carcinome hépatocellulaire, CHC).

Ce cancer très grave dépourvu de traitement est à l'heure actuelle la 2ème cause de mortalité par cancer dans le monde. Les mécanismes moléculaires déterminant la progression de la NASH vers un cancer du foie restent encore mal compris et représentent un enjeu majeur de santé publique. Des études récentes ont montré que le développement du CHC était intimement lié à un contexte d'altérations génétiques, métaboliques et inflammatoires favorisant un remaniement du cycle de division de l'hépatocyte.

Dans ce cadre notre équipe s'intéresse à décrypter les mécanismes cellulaires et moléculaires régulant le cycle de division des hépatocytes pour assurer ainsi le maintien de l'intégrité du tissu hépatique. Nous nous intéressons plus particulièrement aux conséquences de la perte d'expression de différents gènes clés, retrouvés mutés dans le CHC humain, sur la division des hépatocytes. Nous cherchons à comprendre les interactions des hépatocytes avec les cellules de l'immunité pour pouvoir déterminer de nouvelles stratégies de traitement des maladies du foie.

Pour répondre à ces questions, nous utiliserons plusieurs lignées de souris génétiquement modifiées et le nombre de souris utilisées sera d'au maximum 900.

Les procédures expérimentales mises en jeu dans ce projet respecteront les exigences de remplacement, réduction et raffinement d'une part, car elles ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants (nécessité d'un organisme entier, vivant, proche de l'homme) et d'autre part, les groupes seront constitués du minimum d'animaux nécessaire et suffisant pour permettre une analyse statistique robuste des effets observés. Nous pourrions être amenés à manipuler moins de souris si l'effet observé s'avère

significatif au cours des premières expériences. L'étude sera arrêtée si l'expérience initiale invalide l'hypothèse de travail.

Les animaux sont observés quotidiennement afin de respecter leur bien-être. Les souris sont placées dans des conditions optimales (température, hygrométrie, cycle jour nuit 12h/12h, enrichissement des cages, nourriture ad libitum). Les manipulations seront réalisées dans le souci constant de réduire au maximum l'inconfort et la souffrance des animaux. Toute manipulation invasive (injection intra-orbitaire) sera précédée d'une courte anesthésie générale (mélange gazeux d'O₂-Isofluorane [0.5-2.5%]). La mise en place d'une grille de suivi strict des points limites permettra d'éviter au maximum le stress et/ou la douleur au cours de l'expérimentation. Dans le cas où un point limite est atteint avant la fin de l'expérimentation, l'euthanasie anticipée de l'animal sera faite. Enfin une veille scientifique continue sera effectuée, évitant ainsi toute expérimentation déjà rapportée dans la littérature.

Ainsi, les résultats de notre projet permettront de déterminer les mécanismes par lesquels l'hépatocyte assure le maintien de l'intégrité du génome, lors des maladies métaboliques et inflammatoires conduisant au développement d'un cancer du foie. Les retombées de nos travaux devraient conduire à élaborer chez l'Homme de nouveaux outils diagnostic/pronostic et des stratégies thérapeutiques innovantes pour ce cancer grave sans traitement effectif.

10014 Les syndromes d'hypoventilation alvéolaire centrale sont des pathologies qui résultent de désordres neurologiques affectant les centres à l'origine de l'élaboration de la commande respiratoire. Ces syndromes englobent différentes pathologies comme le syndrome d'hypoventilation associé à une obésité précoce, le syndrome d'Ondine et le syndrome d'hypoventilation associé à l'obésité.

Le syndrome d'hypoventilation associé à l'obésité (IMC supérieur à 30 kg/m²) est caractérisé par une hypoventilation diurne associée à une hypercapnie (le CO₂ n'est pas suffisamment éliminé) et un désordre respiratoire durant la phase de sommeil, certains patients présentent des apnées et un inconfort respiratoire (dyspnée), la morbidité et mortalité sont accrues chez ces patients. L'hypoventilation n'est pas due à une maladie pulmonaire, à un trouble de la paroi thoracique (autre que la surcharge pondérale due à l'obésité), à une faiblesse musculaire ou un syndrome d'hypoventilation alvéolaire congénitale connu. Un dysfonctionnement des systèmes leptinergiques semble sous-tendre les altérations de la respiration. Notre unité de recherche est particulièrement intéressée par les syndromes d'hypoventilation centrale. Ainsi, dans le cadre d'études cliniques réalisées au sein de notre laboratoire, une récente observation a mis en évidence, chez deux patientes adultes atteintes d'un autre syndrome d'hypoventilation centrale (syndrome d'Ondine), une récupération de la chémosensibilité au CO₂ corrélée à la consommation de désogestrel, un contraceptif (progestatif de synthèse).

La manipulation des systèmes leptinergiques chez des modèles murins développant une obésité « B6 obèses (B6.V-Lepob/JRj) » pourrait améliorer la respiration et nous permettre d'analyser les mécanismes impliqués. Il nous sera alors possible d'identifier de possibles points de convergence entre la leptine et le progestatif. Ce point est particulièrement important dans la perspective éventuelle de manipuler pharmacologiquement ces systèmes dans le cadre de la prise en charge thérapeutique des patients atteints de syndrome d'hypoventilation centrale associé à l'obésité.

L'objectif sera de déterminer les mécanismes impliqués dans les interactions fonctionnelles entre les systèmes progestéronergiques et la commande respiratoire chez l'animal via des approches non réalisables chez l'Homme. L'utilisation de neurones isolés en culture cellulaire ne permet pas d'appréhender les relations entre les différentes structures neuronales. Les expérimentations à réaliser permettront de caractériser l'action des systèmes progestéronergiques et des systèmes leptinergiques sur la commande respiratoire ainsi que les mécanismes impliqués (régions encéphaliques, populations cellulaires et les systèmes de neurotransmission). Ces expérimentations seront menées suivant 3 procédures expérimentales chez des animaux génétiquement modifiés développant une obésité « B6 obèses (B6.V-Lepob/JRj) ». Les effectifs visés doivent se situer entre 15 et 20 de façon à mettre en œuvre un calcul de puissance afin d'ajuster au minimum l'effectif d'animaux nécessaire dans chacune des procédures expérimentales. Des mâles et des femelles seront utilisés dans ce projet afin de minimiser le nombre d'animaux utilisés. Ainsi, les effectifs envisagés sont de 105 souris nouveau-nées et 40 souris adultes. Les

souris sont hébergées avec leurs congénères (6 par cage maximum) et l'isolement est évité au maximum. Le milieu est enrichi avec au choix : lanières de papier Kraft, maisons en carton, tunnel en carton ou carré de coton compacté. Le bien-être des animaux sera vérifié quotidiennement. Des méthodes expérimentales visant à réduire à son maximum la souffrance animale sont mises en œuvre grâce à l'utilisation d'anesthésiques et d'analgésiques appropriés. Les expériences seront menées par des personnels hautement qualifiés dans des locaux d'hébergement respectant les standards en vigueur. Lorsque cela sera possible, ce seront les mêmes animaux qui seront engagés dans l'analyse de la commande respiratoire et de réseaux neuronaux modulant la respiration et dans l'analyse des populations cellulaires impliquées.

10015 Projet :

Un ensemble de données récentes suggèrent une implication du système immunitaire, et plus particulièrement des lymphocytes T, dans la physiopathologie de diverses maladies neurodégénératives, notamment la maladie d'Alzheimer ainsi que d'autres pathologies liées à la protéine Tau. Néanmoins, la nature et le rôle exact des cellules T impliquées restent très mal définis. L'objectif de ce projet est de mieux caractériser le rôle de ces réponses immunitaires dans le développement de ces maladies neurodégénératives liées à la protéine Tau. La stratégie expérimentale est basée sur l'utilisation d'une lignée de souris transgéniques modélisant la pathologie Tau, ainsi que d'autres lignées permettant d'éliminer sélectivement certaines cellules immunitaires spécifiques.

L'ensemble du projet consistera à caractériser l'impact, sur la physiopathologie de la maladie, de la déplétion ou l'amplification sélective de différentes populations de cellules T. A terme, l'ensemble de ces études devrait ouvrir de nouvelles pistes dans le développement de stratégies innovantes d'immunothérapie pour le traitement de ces maladies neurodégénératives liées à la protéine Tau.

Type d'animaux : Souris commerciales C57BL/6j et souris génétiquement modifiées pour les différents gènes d'intérêts.

Nombre d'animaux :

Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 1864 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 intégré est nécessaire pour étudier les acteurs mis en jeu dans le développement de la maladie d'Alzheimer. A l'heure actuelle il n'est pas possible de recréer in vitro la complexité d'un organisme entier avec tous les acteurs cellulaires rentrant en jeu dans les pathologies liées au vieillissement.

Réduction : Nous limitons au maximum le nombre d'animaux par groupe de façon à obtenir des résultats statistiquement fiables. Du fait des variabilités inter-animales et intergroupes, un nombre trop restreint d'animaux engendrerait des résultats trop variables et non valides. Compte tenu des données de la littérature (variabilité attendue) et des effets espérés, un test de puissance statistique a été utilisé pour déterminer le nombre minimum d'animaux nécessaires pour ce projet.

Raffinement : Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des procédures ont été mise au point afin de permettre une interprétation fiable dans le respect du bien-être animal, en limitant la douleur et le stress (anesthésie, analgésie, etc.). Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation, les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum. Le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification ou de maison de type igloo. Nous nous efforçons à chaque instant de raffiner nos procédures afin de garantir le bien-être des animaux en cours de procédure grâce à une surveillance attentive (point limite) et des soins adaptés.

10016 Les dégénérescences rétinienne affectent un nombre croissant de personnes dans une population mondiale vivant de plus en plus âgées. Trouver des traitements efficaces pour contrer l'évolution de la maladie menant à la cécité est un enjeu crucial de santé publique.

Dans ce projet, nous allons tester le pouvoir thérapeutique d'une à cinq molécules que nous appellerons M1 à M5 sur 2 modèles murins de dégénérescence rétinienne : un modèle inné et un modèle induit. Nous testerons les molécules une à une.

Pour le modèle de dégénérescence innée, nous utiliserons une lignée de rats connus pour être touchée par une dégénérescence rétinienne héréditaire. Dans le second modèle la dégénérescence rétinienne est induite par inhibition du système S sur des rats « normaux ».

L'efficacité thérapeutique de nos molécules sera évaluée par analyse de la structure de la rétine par imagerie in vivo et de la fonction rétinienne par des électrorétinogrammes.

Au total 600 animaux seront nécessaires à cette étude en incluant les contrôles.

L'utilisation du modèle animal est indispensable pour cette étude. L'activité rétinienne ne peut être mesurée que par des tests in vitro.

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.

Les rats seront examinés quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries. Les animaux sont hébergés dans les conditions conformes à la réglementation. Les rongeurs bénéficieront d'une anesthésie générale fixe ou gazeuse pour les différentes procédures expérimentales et d'une anesthésie cornéenne lors des injections intraoculaires et les électrorétinogrammes. Une signalétique particulière des animaux en expérimentation est utilisée. Une observation régulière des animaux est effectuée pour s'assurer du bien-être des animaux.

10017 Les maladies métaboliques, telles que l'obésité et le diabète de type 2, ont une prévalence en constante augmentation au niveau mondial. Ces pathologies sont étroitement associées à une diminution de l'action de l'insuline, ou insulino-résistance, dans les tissus périphériques cibles de l'insuline. Il a été montré d'autre part qu'il y avait une altération de la fonction barrière de l'intestin des patients obèses ou diabétiques, et que cette altération pourrait être impliquée dans l'établissement de l'inflammation de bas grade qui caractérise ces pathologies.

L'objectif de ce projet est d'évaluer si l'insulino-résistance est impliquée dans les modifications de la susceptibilité à l'inflammation de l'intestin et dans les altérations de sa fonction barrière. Nous allons donc étudier si une insulino-résistance généralisée, induite par un régime hyperlipidique, ou une insulino-résistance restreinte au niveau de l'épithélium intestinal, induite dans une lignée de souris génétiquement modifiée, modifient la susceptibilité des souris à la colite consécutive à une infection par *C. rodentium*. L'inflammation colique induite par *C. rodentium* est un modèle animal très utilisé pour étudier des pathologies humaines telles que les colites infectieuses ou les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI). La bactérie *C. rodentium* est un pathogène naturel de la souris qui colonise la muqueuse colique et induit une inflammation, une dysfonction de la barrière épithéliale et une diarrhée. Chez des souris immunocompétentes, une infection avec *C. rodentium* entraîne une diarrhée et perte de poids modeste et transitoire et ces symptômes disparaissent en 3 à 4 semaines. Une augmentation de la susceptibilité à l'inflammation colique se traduit par une colonisation plus importante de la muqueuse intestinale, ainsi qu'une diarrhée et une perte de poids plus rapides et plus importantes chez les animaux concernés. Pour ce projet nous utiliserons une souche de *C. rodentium* qui exprime la luciférase, ce qui va permettre de suivre le développement et la résolution de l'inflammation du colon au cours du temps chez les mêmes animaux en utilisant une technique d'imagerie par bioluminescence in vivo chez le petit animal.

Dans ce projet nous utiliserons 200 souris. Ce projet faisant appel à des interactions hôte-pathogène ne peut être réalisé qu'in vivo. Nous serons extrêmement attentifs à ce que notre démarche soit en conformité avec les exigences de réduction et de raffinement. Les protocoles ont été élaborés pour utiliser le nombre minimal d'animaux permettant d'obtenir des résultats statistiquement satisfaisants. Nous nous attacherons également à limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux, une surveillance journalière sera réalisée en respectant des ponts limites bien définis, entraînant l'euthanasie anticipée de l'animal si nécessaire.

A terme, les résultats de ce projet permettront de comprendre plus précisément les inter-relations existant entre les altérations métaboliques et l'insulino-résistance consécutives à l'ingestion d'un régime alimentaire hyperlipidique et la susceptibilité à l'inflammation colique.

10018 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.

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 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 développé une thérapie non virale basée sur l'introduction d'un plasmide dans le muscle ciliaire par électrotransfert. Ce plasmide permet l'expression par les cellules du muscle ciliaire de la protéine thérapeutique (Protéine 6) qui neutralise le TNF-alpha (cytokine pro-inflammatoire). Cette technologie permet une expression ciblée et à long terme de la protéine thérapeutique, d'éviter ainsi un excès de TNF-alpha, et donc la dégénérescence des photorécepteurs.

L'objectif de nos études est de déterminer l'effet neuroprotecteur de la Protéine 6 dans un modèle génétique de dégénérescence rétinienne, le rat Royal College of Surgeons (RCS) porteur d'une mutation dans une protéine spécifique de l'épithélium pigmentaire rétinien. Ce défaut conduit à une perte progressive des photorécepteurs reproduisant une des caractéristiques observées dans les rétinopathies humaines. Le présent projet correspond à une extension d'un projet existant ayant reçu un avis favorable par le comité d'éthique et devant se dérouler dans un autre établissement utilisateur. Le projet initial a permis de détecter une réponse partiellement positive (préservation des photorécepteurs en rétine périphérique) au traitement chez des animaux âgés de 28 jours ce qui suggère qu'il est nécessaire de traiter les animaux plus précocement. L'ensemble du projet nécessitera 96 rats.

Dans le cadre de la règle des 3R, le rat RCS est un modèle de dégénérescence rétinienne reconnu permettant de démontrer l'efficacité de notre technologie. En effet, la mise en place de culture de cellules du muscle ciliaire permettant d'appliquer les conditions électriques de l'électrotransfection 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. La procédure d'électrotransfection est standardisée sur les deux yeux afin de réduire le nombre d'animaux à utiliser et obtenir des résultats statistiquement exploitables. La procédure mise en place pour réaliser ce projet est peu traumatique, de courte durée et est réalisée 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.

10019 La sclérose en plaques (SEP) affecte le système nerveux central et est la conséquence d'une attaque incontrôlée par le système immunitaire de la gaine de myéline entourant les fibres nerveuses. Cette gaine qui est essentielle à la propagation du signal nerveux, est alors détruite, entraînant l'apparition de certains symptômes tels que des handicaps moteurs, des troubles de la vue, une faiblesse musculaire ou des engourdissements. Une des étapes clés dans l'apparition de la maladie est le passage des cellules immunitaires du sang vers le système nerveux central (SNC). Ce passage est strictement contrôlé dans les conditions normales et notre projet vise à étudier les mécanismes qui contrôlent la migration des cellules immunitaires dans un modèle expérimental murin de SEP, l'EAE (encéphalite auto-immune expérimentale). Le modèle de l'EAE permet d'étudier la maladie dans un organisme entier qui ne peut pas être dupliqué en utilisant des tissus seuls. Nous avons suivi la règle des 3R en introduisant des points limites à notre protocole. En revanche, et à notre connaissance après une recherche dans plusieurs bases de données de la littérature scientifique, il n'y a pas d'alternative à l'utilisation de modèles animaux pour étudier la sclérose en plaques. En conséquence, nous prévoyons l'emploi d'un modèle murin simple que nous maîtrisons parfaitement au laboratoire et un total de 120 souris seront nécessaires pour ce projet.

La règle des 3 R a été considérée pour la mise en place du projet :

-Remplacement : Les animaux ne peuvent pas être remplacés dans ce type d'expériences. La culture cellulaire, du fait de sa connectivité réduite, ne reproduit pas toutes les propriétés.

-Réduction : Le nombre d'animaux suffisants pour permettre des données statistiquement fiables. Les études in vivo développées dans ce projet permettent des approches fonctionnelles sans

euthanasie de l'animal permettant un suivi pendant plusieurs semaines réduisant ainsi le nombre d'animaux utilisés.

-Raffinement : Le stress/fatigue/douleur de l'animal est réduit à son maximum par une surveillance quotidienne, la mise en place de gel alimentaire et l'expérimentation réduit à 25 jours.

10020 La fibrose hépatique est la conséquence de toutes les maladies chroniques du foie. Elle est caractérisée par une synthèse accrue et un dépôt de matrice extracellulaire (MEC) de composition altérée, et elle aboutit inéluctablement à la cirrhose en l'absence de traitement de la cause, voire au carcinome hépatocellulaire.

Les myofibroblastes, acteurs majeurs de la fibrogenèse, synthétisent la MEC pathologique. Ces cellules sont absentes du foie sain. Si les cellules étoilées du foie (CEF) ont longtemps été considérées comme la principale source de ces myofibroblastes, l'implication des myofibroblastes portaux dans la fibrose est maintenant clairement démontrée. Le but de notre étude est de mieux caractériser le rôle des différents types de myofibroblastes dans la progression de la fibrose hépatique. Pour cela, nous utilisons des modèles de cellules en culture.

Les CEF et des segments de canaux biliaires sont isolés à partir de foie de souris et/ou de rat. Au cours de la culture, les CEF et les cellules mésenchymateuses associées aux canaux biliaires acquièrent un phénotype myofibroblastique proche de celui observé in vivo.

Type d'animaux : Souris C57BL/6J et rats Sprague-Dawley, modèles commerciaux.

Nombre d'animaux :

Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 304 souris et 200 rats expérimentaux 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 : Ce projet est basé sur l'étude des différents types de myofibroblastes dans la progression de la fibrose hépatique à travers un modèle de culture primaire. Notre projet s'inscrit donc pleinement dans le cadre de modèle de remplacement des modèles animaux couramment utilisés dans le domaine.

Réduction : Ce projet s'inscrit tout à fait dans l'objectif de Réduction puisque nous souhaitons étudier les mécanismes de la fibrose hépatique dans un modèle ex vivo dans lequel le nombre d'animaux utilisé est drastiquement réduit comparé aux modèles classiques.

Raffinement : Dans la réalisation de ce projet, les procédures ont été mises au point afin de permettre une interprétation fiable dans le respect du bien-être animal, en limitant la douleur et le stress. 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.

10021 Les formations spécifiques en expérimentation animale constituent une obligation réglementaire à laquelle doivent se soumettre tous les acteurs de la recherche in vivo afin d'acquérir les outils nécessaires à la mise en place d'une démarche éthique prenant en considération la sensibilité animale. Ces formations ont ainsi pour objectif de sensibiliser les personnels impliqués afin de minimiser les contraintes imposées aux animaux lors des procédures expérimentales. Les personnes amenées à concevoir des projets comprenant des interventions chirurgicales ou amenées à réaliser ces interventions doivent obligatoirement suivre une formation spécifique afin d'acquérir les bases en chirurgie et garantir ainsi la mise en œuvre de bonnes pratiques par des personnes compétentes. Ces formations nécessitent donc le recours à l'animal afin d'apprendre sur l'animal les gestes de base qui seront par la suite réalisés lors des procédures expérimentales. Le projet soumis concerne une formation destinée aux concepteurs de projets incluant des interventions chirurgicales et aux personnes réalisant ces interventions. Cette formation qui s'inscrit dans un cadre réglementaire a déjà reçu en 2010 puis en 2015 une approbation pour 5 ans par le

Ministère de l'Agriculture. Tous les personnels impliqués en expérimentation in vivo devant suivre cette formation, 4 à 6 sessions sont prévues par an ce qui implique, sur une période de 5 ans, l'utilisation pour les travaux pratiques de 360 souris et 1140 rats maximum. Au cours des TP, un entraînement sur des supports inertes est imposé préalablement à l'application des techniques sur l'animal anesthésié afin de s'assurer de la maîtrise des gestes par les stagiaires. L'ensemble des procédures chirurgicales comprend une prise en charge antalgique des animaux ainsi que la définition de points limites assurant un suivi post-opératoire optimal.

10022 Les maladies métaboliques, telles que l'obésité et le diabète de type 2, ont une prévalence en constante augmentation au niveau mondial. Ces pathologies sont étroitement associées à une diminution de l'action de l'insuline, ou insulino-résistance, dans les tissus périphériques cibles de l'insuline. Il a été montré d'autre part qu'il y avait une altération de la fonction barrière de l'intestin des patients obèses ou diabétiques, et que cette altération pourrait être impliquée dans l'établissement de l'inflammation de bas grade qui caractérise ces pathologies.

L'objectif de ce projet est d'évaluer si l'insulino-résistance est impliquée dans les altérations de la fonction barrière de l'intestin, et plus particulièrement la fonction barrière vis à vis des bactéries présentes dans la lumière intestinale. Nous allons donc étudier si une insulino-résistance généralisée, induite par un régime hyper-lipidique, ou une insulino-résistance restreinte au niveau de l'épithélium intestinal, induite dans une lignée de souris génétiquement modifiée, modifient l'adhérence d'une bactérie à la surface de l'épithélium intestinal et son passage à travers l'épithélium vers les tissus voisins. Pour cela nous allons gaver des souris avec une souche d'*Escherichia coli* exprimant la protéine GFP (Green Fluorescent Protein) de façon à pouvoir suivre la colonisation de l'épithélium intestinal et son transfert vers d'autres organes.

Dans ce projet nous utiliserons 240 souris. Ce projet faisant appel à des interactions hôte-pathogène ne peut être réalisé qu'in vivo. Nous serons extrêmement attentifs à ce que notre démarche soit en conformité avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement. Les protocoles ont été élaborés pour utiliser le nombre minimal d'animaux permettant d'obtenir des résultats statistiquement satisfaisants. Nous nous attacherons également à limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux, une surveillance journalière sera réalisée en respectant des points limites bien définis, entraînant l'euthanasie anticipée de l'animal si nécessaire.

A terme, les résultats de ce projet permettront de comprendre plus précisément les inter-relations existant entre les altérations métaboliques et l'insulino-résistance consécutives à l'ingestion d'un régime alimentaire hyperlipidique et les altérations de la fonction barrière de l'intestin.

10023 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. Les muscles des patients DMD sont caractérisés par une absence de protéine dystrophine. Cependant, il existe un faible pourcentage des fibres musculaires des patients qui sont positives pour la dystrophine. Il s'agit des « fibres révertantes » qui ré-expriment la dystrophine. Ce phénomène est connu depuis plus de 25 ans mais les mécanismes cellulaires et moléculaires à l'origine de cette « autocorrection » des fibres sont encore méconnus. Une meilleure compréhension de la physiopathologie de cette maladie pourrait à terme avancer le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à amplifier ces fibres révertantes chez les patients.

Récemment un modèle murin de la DMD permettant de suivre les fibres révertantes a été généré. Ce modèle permet d'identifier directement par fluorescence les fibres musculaires révertantes (corrigées) qui ré-expriment la dystrophine dans le contexte pathologique.

Ce projet consiste à étudier le rôle des cellules souches musculaires, appelées cellules satellites, dans la formation des fibres révertantes in vivo, en évaluant leur comportement au cours de la régénération musculaire. Il s'agira d'injecter des cellules satellites isolées à partir de fibres révertantes dans le muscle Tibialis Anterior (TA) de souris immunodéficientes/dystrophiques.

64 souris immunodéficientes/dystrophiques seront utilisées. Afin de réduire le nombre de souris dans le respect de la règle des 3R, les deux TA seront injectés, réduisant ainsi le nombre des souris utilisé de la moitié. Les souris sont anesthésiées par injection de Kétamine/Xylazine. En post-opératoire les animaux recevront un analgésique (Buprenorphine). Suite au réveil, les animaux

seront surveillés quotidiennement pendant toute la durée de l'expérience afin de détecter des signes de douleur. Les animaux qui montrent un signe quelconque de détérioration de leur santé seront euthanasiés.

10024 Le cancer du foie constitue la deuxième cause mondiale de morts liées au cancer. Le carcinome hépatocellulaire (CHC) en constitue la forme primitive la plus fréquente avec environ 500 000 nouveaux cas/an. Il survient sur des foies malades, touchés par des hépatites virales ou toxiques (alcool) ou des foies gras à cause de maladies métaboliques (obésité en particulier). Le pronostic du CHC reste très sombre avec un taux de survie à cinq ans n'excédant pas 20%.

La chirurgie est le principal traitement curatif mais seule une minorité de patients (<40%) peut en bénéficier et le traitement palliatif du CHC non opérable n'a qu'une efficacité très modérée avec seulement quelques mois de survie supplémentaire. D'autre part ce cancer est presque toujours détecté tardivement et il n'existe pas encore d'outils diagnostiques sensibles et fiables qui permettraient de détecter les malades précocement. Il paraît donc essentiel de décrypter les mécanismes moléculaires impliqués au cours du processus tumoral afin de trouver de nouveaux outils diagnostiques et de nouvelles pistes thérapeutiques.

Dans ce but, nous étudierons 2 modèles murins reproduisant l'activation de l'oncogène le plus fréquemment impliqué dans le développement du CHC. Nous rechercherons les effets précoces et la spécificité des tumeurs associés à l'activation de cet oncogène. D'autre part, nous envisageons d'invalider 3 gènes qui semblent avoir un rôle majeur dans ce contexte de CHC pour analyser leurs implications dans la survenue et la progression des CHC.

- A ce stade de notre projet qui s'appuie sur des premiers résultats in vitro et sur un précédent projet in vivo qui a été agréé d'un point de vue éthique, il n'existe pas de technique permettant de remplacer l'expérimentation animale pour étudier le développement tumoral qui est le résultat d'interactions complexes entre la tumeur, son tissu d'origine et son environnement.

- Pour respecter la règle des 3R, les procédures expérimentales ont été réfléchies afin de minimiser le nombre d'animaux utilisés tout en permettant une analyse statistique valable. Nous prévoyons l'utilisation de 460 animaux pour mener à bien ce projet.

- Du fait de notre expertise (15 ans de recherche dans ce domaine) nous connaissons les 2 phases possiblement délétères de nos modèles murins. La première phase prend place 3 semaines après une invalidation génique dans le foie et la deuxième en cas de développement tumoral très important. Pour les études à court terme (initiation tumorale) les animaux seront euthanasiés avant la première phase. Pour les études à long terme (tumeurs), les procédures se dérouleront avec une surveillance adaptée lors de la première phase et les animaux seront euthanasiés pour prélèvement avant un développement tumoral pouvant les faire souffrir (avant le 12ème mois post induction tumorale).

En conclusion, notre hypothèse est que les 2 gènes que nous souhaitons inactiver dans le foie normal ont une importance cruciale dans la cancérisation du foie. Ils pourraient donc être la source de pistes thérapeutiques ou d'outils diagnostiques.

La mise en œuvre de notre projet permettra de répondre à cette question, rendue cruciale par le fait que le CHC manque cruellement d'options thérapeutiques à ce jour.

10025 Le tube digestif est un organe vital doté de fonctions antagonistes, qui joue un rôle majeur dans la digestion et l'absorption des nutriments alimentaires et qui, parallèlement, constitue la barrière la plus importante entre l'intérieur de l'organisme et le milieu extérieur. La capacité de l'épithélium à contrôler l'absorption des molécules dans l'organisme est appelée « fonction barrière ». La structure complexe de la barrière intestinale constitue une ligne de défense à la fois immunologique, physiologique et physique.

De façon intéressante, de nombreuses études suggèrent que, dans les cas d'obésité et de diabète de type 2, une augmentation transitoire de la perméabilité intestinale pourrait favoriser le passage d'endotoxines bactériennes dans la circulation systémique et le développement d'une inflammation de bas grade, caractéristique de ces maladies métaboliques. L'objectif de ce projet est d'évaluer si l'insuline, en agissant spécifiquement au niveau des cellules épithéliales de l'intestin, contribue au maintien des fonctions intestinales et de l'homéostasie glycémique. Nous chercherons notamment

à déterminer si une résistance intestinale à l'action de l'insuline pourrait constituer un événement précoce de l'augmentation de la perméabilité au cours du diabète et de l'obésité. Pour étudier les relations entre perméabilité intestinale et inflammation, seule une approche intégrée par l'expérimentation animale, mimant le développement de l'obésité, est envisageable et ne peut être substituée par des analyses réalisées uniquement in vitro.

Dans ce projet, nous utiliserons une lignée de souris génétiquement modifiées dont le phénotype n'est pas dommageable. Pour développer une obésité, ces souris seront nourries avec un régime hyper-lipidique et nous analyserons l'impact sur la perméabilité intestinale et les changements des paramètres métaboliques en réalisant des tests fonctionnels dont certains sont non-invasifs. Des modèles de colites et d'inflammation systémique seront utilisés pour analyser le contrôle de la perméabilité intestinale dans un contexte inflammatoire.

Nous serons extrêmement attentifs à ce que notre démarche expérimentale soit en conformité avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement. Tout au long de cette étude, nous réévaluerons la possibilité de faire appel à des méthodes alternatives et des modèles in vitro afin de limiter au maximum l'utilisation d'animaux. Le nombre de souris utilisées pour ce projet sera de 540. Concrètement, les différents protocoles expérimentaux ont été consciencieusement pensés et élaborés afin d'utiliser le moins d'animaux possible tout en permettant d'obtenir des résultats statistiquement satisfaisants. Nous nous attacherons également à limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux, une surveillance journalière sera réalisée en respectant des points limites bien définis, entraînant l'euthanasie anticipée de l'animal si nécessaire. De plus, toutes les procédures chirurgicales se feront sous anesthésie générale.

A terme, les résultats de ce projet permettront de comprendre plus précisément les mécanismes impliqués dans la régulation des fonctions intestinales par l'insuline. Ils pourraient renforcer ou infirmer l'idée selon laquelle l'utilisation de thérapeutiques agissant sur le récepteur intestinal à l'insuline pourrait avoir un effet bénéfique chez des patients diabétiques

10026 La fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) est une maladie sévère pour laquelle les ressources thérapeutiques sont très limitées. Son pronostic est proche de celui du cancer broncho-pulmonaire (50% de survie à 2 ans). Elle est assimilable à un vieillissement accéléré du tissu pulmonaire, remplacé par de la fibrose constituée de dépôts de collagène, modifiant l'architecture du poumon et le rigidifiant, de sorte qu'il devient incapable d'assurer les échanges gazeux d'oxygène et de gaz carbonique. Un patient atteint ressentira un essoufflement progressivement croissant, pour des efforts de moins en moins intenses.

Ce phénomène de fibrogenèse (constitution de la fibrose) est commun à la FPI et à d'autres maladies respiratoires. Toutefois, sa cause et les mécanismes qui sous-tendent sa progression sont mal connus. Parmi ces mécanismes, l'hypoxie (diminution locale de la quantité d'oxygène) semble jouer un rôle important dans la progression de la fibrose, notamment par le biais de la synthèse du facteur de transcription nommé HIF- α (hypoxia-inducible factor alpha). D'une part, cette molécule est retrouvée aussi bien dans les cellules pulmonaires de patients atteints de FPI que celles de souris chez lesquelles une fibrose pulmonaire a été provoquée par moyen chimique (instillation de bléomycine). Par ailleurs, des études animales ont montré que l'augmentation du taux d'HIF- α dans des cellules de rein ou de foie accélère la fibrogenèse dans ces organes.

Notre projet consiste à créer un modèle de souris génétiquement modifiées présentant une augmentation du taux d'HIF- α dans les cellules pulmonaires, qui n'existe pas à l'heure actuelle, afin de mieux étudier le rôle de cette molécule dans la fibrogenèse pulmonaire.

Une fois ce modèle à disposition, il nous sera possible de comparer ces souris à des souris contrôles, à l'état basal et après instillation de bléomycine. Les comparaisons porteront sur la survie des souris des deux groupes, sur des dosages de marqueurs de l'inflammation, et sur l'étude histologique de leurs poumons. A terme, si le rôle de l'hypoxie dans la fibrogenèse pulmonaire est confirmé, les molécules générées par le poumon malade en condition d'hypoxie pourraient devenir des cibles thérapeutiques afin de freiner la constitution d'une fibrose du tissu pulmonaire. Sur le plan scientifique, notre modèle de souris génétiquement modifiées devrait présenter une sensibilité accrue à l'hypoxie, il pourrait permettre d'étudier d'autres situations pathologiques dans lesquelles l'hypoxie tient un rôle important.

En accord avec la législation en vigueur concernant l'expérimentation animale, nous veillerons à suivre la règle des 3R en réduisant le nombre de souris utilisées au cours de ce projet grâce à des calculs statistiques, en réutilisant les animaux issus de procédures légères pour la reproduction et le maintien de colonie, en utilisant un hébergement amélioré et ayant défini des points d'arrêt d'expérimentation et en remplaçant le modèle in vivo par des cultures cellulaires primaires. Le nombre total d'animaux prévu pour ce projet est de 570.

10027 Le système lymphatique dans les méninges est une nouvelle découverte. Ce système nettoie le cerveau, ce qui est important afin d'assurer toutes les fonctions du cerveau. Le développement des méthodes non-invasives qui permettent de visualiser ce système en temps réel est crucial pour comprendre comment ce système fonctionne et se développe, et notamment pour évaluer les rôles de ce système dans les physiopathologies cérébrales. Ce projet a pour objectif : 1. Mettre un point l'utilisation des souris comme modèle qui permet d'étudier ce système d'une façon non-invasive en utilisant l'IRM. L'IRM du petit animal est une technique non-invasive et non destructive pour l'imagerie du petit animal in vivo. Elle permet l'étude longitudinale et tridimensionnelle notamment du cerveau normal et pathologique, et permettra d'évaluer les fonctionnes de drainage des agents de contraste qui seront injectés par voie intraveineuse. 2. Décrire l'anatomie du système lymphatique dans le cerveau de souris. Nous utiliserons sur 1 an un total de 20 souris. La règle des 3R a été considérée pour la mise en place du projet et sera appliquée sur le terrain : 1) Remplacement, les études in vitro et sur animaux invertébrés ne permettent pas l'étude de comportements complexes ; le rongeur est donc une des espèces les plus appropriées pour ce type d'étude. 2) Réduction, le nombre d'animaux utilisés est réduit au minimum pour nous permettre de générer des données statistiques solides ; 2) Raffinement, les procédures prennent en compte des temps de récupération et des nombres d'essais visant à réduire le stress et la fatigue des animaux ;

10028 Les dégénérescences rétinienne affectent un nombre croissant de personnes dans une population mondiale vivant de plus en plus âgées. Trouver des traitements efficaces pour contrer l'évolution de la maladie menant à la cécité est un enjeu crucial de santé publique.

Dans la littérature scientifique il a été décrit de nombreux facteurs ayant un rôle fondamental dans le développement de la rétine et le maintien de son intégrité.

Nous avons sélectionné l'un d'entre eux qui affecte la survie des photorécepteurs ; nous l'appellerons « la protéine T ».

Dans ce projet, nous voulons voir si une administration de cette protéine (sous forme simple ou par l'intermédiaire d'un vecteur viral) au niveau oculaire permet de prévenir la dégénérescence rétinienne chez l'animal. Ces études seront menées sur un modèle murin de rétinopathie pigmentaire couramment utilisé par la communauté scientifique : le rat P23H.

Au total 130 rats P23H seront nécessaires à cette étude en incluant les contrôles.

L'utilisation du modèle animal est indispensable pour cette étude. L'activité rétinienne de ne peut être mesurée par des tests in vitro.

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.

Les rats seront examinés quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries. Les animaux sont hébergés dans les conditions conformes à la réglementation. Les rongeurs bénéficieront d'une anesthésie générale (fixe ou gazeuse pour les différentes procédures expérimentales et d'une anesthésie cornéenne lors des injections intraoculaires et les électrorétinogrammes. Une signalétique particulière des animaux en expérimentation est utilisée. Une observation régulière des animaux est effectuée pour s'assurer du bien-être des animaux.

10029 Ce projet vise à comprendre les mécanismes du développement du parasite Plasmodium rendant compte du degré de gravité/sévérité du paludisme. Le recours à l'expérimentation animale est justifié par i) l'éloignement du terrain où co-circulent des espèces plasmodiales dont la pérennité repose sur des moustiques et des êtres humains, ii) l'établissement de modèles animaux reposant sur la souris, permettant de reproduire en partie des éléments de la physiopathologie des accès

palustres dont la gravité varie et iii) le recours à l'animal est indispensable si l'on veut pouvoir étudier la biologie du parasite dans son ensemble, en suivant en parallèle le devenir du parasite dans les différents tissus cibles connus : peau, ganglion lymphatique, foie. Les résultats issus de cette étude auront un impact considérable sur la prise en charge du paludisme chez l'homme.

Bien que le paludisme témoigne uniquement de la phase de développement asexuée intra-érythrocytaire de *Plasmodium*, nous avons privilégié une approche intégrée reposant sur l'établissement intramuros du cycle complet de développement de *Plasmodium* chez les moustiques et chez les souris. Pour identifier et caractériser les interactions voire la synergie entre i) les produits de gènes du mammifère modèle qu'est la souris de laboratoire et ii) les produits de gènes du parasite eucaryote qu'est *P. berghei*, rendant compte de l'amplification de processus inflammatoires systémiques et locaux (cerveau), un gène de *P. berghei* sera plus particulièrement étudié : le gène *tctp* (Translationally Controlled Tumor Protein) dont le produit Histamine Releasing Factor (HRF) participe à l'amplification d'un processus inflammatoire de type allergique, au cours de la phase de développement intra-érythrocytaire. Cette protéine a des propriétés pro-inflammatoires puissantes. La mise en œuvre de ce projet nécessite la mise en place de deux procédures :

Procédure 1 : celle-ci vise à obtenir des parasites sous deux formes; la forme érythrocytaire qui nous permet de récolter du sang de souris infectées et que nous répartissons en aliquots qui seront congelés. L'autre forme, ce sont des sporozoïtes que nous récoltons au sein des glandes salivaires de moustiques femelles infectées suite à un repas sanguin sur des souris infectées. Cette procédure n'entraînant aucune lésion, ni inconfort ni douleur est de classe légère.

Procédure 2 : celle-ci consiste à générer des populations de *P. berghei* déficientes pour le gène *hrf*, afin d'étudier leurs propriétés vaccinales une fois inoculées aux souris. Le suivi de la parasitémie au cours du temps, tous les deux jours, par le prélèvement de quelques microlitres de sang à la veine caudale par le moyen d'une seringue à insuline, a l'avantage d'être à la fois une méthode non invasive qui évite de stresser les animaux et permet de réduire le nombre d'animaux utilisés pour le projet. Le suivi de l'infection sera interrompu à chaque fois qu'apparaissent des signes cliniques annonciateurs d'inconfort ou de douleur par la mise en place de points d'arrêts anticipés. Seront également suivis des signes cliniques traduisant des dommages au niveau du cerveau (prostration, parésie du train postérieur) et des paramètres biologiques – dont les niveaux de parasitémie et les caractéristiques de la réponse immunitaire induite chez les souris protégées. La mutation de ce parasite qui a pour but d'atténuer sa virulence, aura pour effet de diminuer l'inconfort et la souffrance des animaux infectés, il s'agit par conséquent de procédures de classe modérée. De plus, toute souffrance apparente de l'animal repérable en surveillance quotidienne : poil hérissé, baisse de la motricité représente un point limite et constitue un critère d'interruption de l'expérience. L'analyse statistique de la comparaison entre groupes de souris qui se fera en utilisant le test non paramétrique Mann-Whitney, permettra une conception optimale des procédures et la réduction du nombre d'animaux sans impacter la qualité des résultats. L'ensemble de ces mesures vise à respecter les critères de raffinement et de réduction. Le nombre d'animaux estimés dans ce projet est d'environ 2880 souris sur les 5 ans.

10030 Chez les patients diabétiques, les altérations de la circulation sanguine cutanée provoquent des ulcérations cutanées chroniques diminuant ainsi la qualité de vie et pouvant conduire à une amputation dans les cas graves.

L'utilisation en clinique de vasodilatateurs par voie sanguine ou orale permet d'améliorer la cicatrisation mais leur utilisation provoque des effets systémiques comme l'hypotension qui peut amener à un arrêt du traitement. Le traitement local des ulcères chroniques permettrait de réduire les effets secondaires liés au traitement et d'augmenter l'efficacité.

Les nanoparticules lipidiques représentent une innovation dans la formulation de médicament. Elles sont caractérisées par des nanoparticules de 1 à 100 nm de diamètre et composées de lipides biocompatibles non toxiques. Nous avons observé que les nanoparticules lipidiques permettent de contrôler le relargage du principe actif et d'avoir une action locale par rapport à une forme pharmaceutique classique.

Cette étude permettra de quantifier l'effet de l'application d'un gel de nanoparticules lipidique encapsulant différents principes actifs sur la cicatrisation d'ulcères cutanées sur des modèles murins diabétiques.

Nous avons choisi de travailler sur un modèle de souris car il est impossible de remplacer l'animal pour représenter le phénomène de cicatrisation sur le long terme (Culture cellulaire, peau de synthèse, simulation informatique). Nous avons réduit le nombre d'animaux utilisés par la réduction du nombre de formulations à tester. Ainsi nous avons présélectionné 3 formulations lors d'une étude précédente et nous réaliserons premièrement une phase de sélection dans cette étude pour choisir entre ces 3 formulations. Les procédures expérimentales suivantes seront réalisées uniquement sur la formulation sélectionnée. Nous utiliserons au total 94 animaux.

Les animaux seront suivis tous les jours pendant le traitement avec un traitement analgésiant adapté et des points limites adaptés afin de raffiner leur utilisation.

10031 La communication inter-atriale est une malformation cardiaque congénitale fréquente qui consiste en un « trou » dans la cloison qui sépare les oreillettes. Initialement, la réparation de ce défaut reposait sur la mise en place d'un patch de fermeture par chirurgie. Depuis une vingtaine d'années, le patch a pu être remplacé par une prothèse en nitinol (alliage de nickel et titane), mise en place par cathétérisme cardiaque (technique qui emprunte les veines pour accéder au cœur). Après implantation, pour éviter la formation de caillot sur la prothèse, un traitement médicamenteux est nécessaire (antiagrégant plaquettaire, médicament empêchant les plaquettes de s'agréger, première étape de la formation d'un caillot), pour une durée de 6 mois à un an. Le cathétérisme cardiaque peut être utilisé dès l'enfance et est une méthode sûre et efficace pour occlure le défaut. Après implantation, la prothèse est peu à peu recouverte d'un tissu, permettant d'éviter la formation de caillots. Cependant, il semble que le recouvrement de la prothèse ne soit pas similaire chez l'ensemble des patients. Certains restent alors à risque qu'un caillot se forme, y compris à distance de l'implantation et de l'arrêt du traitement médicamenteux. Actuellement, le recouvrement tissulaire de la prothèse n'est jamais objectif.

Ce projet a pour but d'utiliser plusieurs techniques d'imagerie (scanner, IRM et élastographie) afin d'évaluer le recouvrement tissulaire d'une prothèse de CIA, in vivo et ex vivo. Un modèle animal ovin sera développé pour répondre à cette problématique. La brebis a été choisie en raison de sa croissance modérée et de la proximité de son anatomie avec l'être humain, notamment au niveau du septum inter-atrial et des oreillettes. L'utilisation de l'animal reste, à ce stade, indispensable, il n'est donc pas possible de REMPLACER le modèle animal. Afin de réaliser ce protocole et d'obtenir des résultats exploitables et significatifs tout en réduisant le nombre d'animaux nécessaire, nous avons fixé une limite maximale de 8 brebis. Les animaux seront répartis en trois groupes pathologiques en fonction de la durée du suivi. Si les objectifs expérimentaux peuvent être atteints par l'utilisation de moins d'animaux, alors aucun animal supplémentaire ne sera utilisé. Nous sommes également en mesure de pratiquer plusieurs types d'imagerie, à la fois in vivo et ex vivo, ce qui nous permettra d'accroître la quantité d'informations obtenues à partir d'un animal et ainsi, de limiter l'utilisation globale des animaux (REDUCTION). Les résultats de cette étude seront précieux pour changer la prise en charge post-implantation de prothèse chez l'être humain. Le respect du bien-être animal dans ce projet repose sur plusieurs mesures de RAFFINEMENT, au niveau des hébergements et de leur prise en charge (locaux agréés, soins quotidiens dispensés par du personnel compétent, une surveillance vétérinaire est assurée, 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) ainsi que lors des procédures (les procédures sont réalisées sous anesthésie générale et une analgésie adaptée est mise en place).

10032 Il est établi que notre régime alimentaire pouvait avoir une influence sur notre santé. En effet, les micronutriments liposolubles (A, D, E, K et lutéine) jouent des rôles clés dans la prévention des pathologies oculaires, osseuses, neurodégénératives, cardiovasculaires et certains cancers. Ainsi les carences en ces micronutriments peuvent engendrer des conséquences extrêmement néfastes pour la santé. C'est pourquoi, la compréhension des mécanismes d'absorption des micronutriments liposolubles est un enjeu majeur.

Les objectifs de cette recherche seront de confirmer in vivo nos résultats préliminaires visant à identifier l'implication d'SR-B1, ABCB1, ABCG5 et ABCG8 dans l'absorption intestinale des micronutriments liposolubles. En effet, ces transporteurs sont connus pour être impliqués dans les mécanismes d'absorption et d'excrétion d'autres composés liposolubles, notamment le cholestérol. Pour cela, nous utiliserons au total maximum 360 souris déficientes en ABCB1a et ABCB1b (ABCB1a/b KO), en ABCG5 et ABCG8 au niveau intestinal (ABCG5/8 iKO), ou surexprimant SR-B1 au niveau intestinal (SR-B1 tg), ainsi que leurs contrôles appariés sur fond génétique FVB ou C57BL/6, ou des souris de type sauvage C57BL/6. Ces souris seront réparties en maximum 60 groupes de 6 individus.

Pour chaque micronutriment, nous mesurerons l'absorption intestinale et le métabolisme de ces micronutriments dans différentes conditions (inhibition de protéines de transport, utilisation de souris génétiquement modifiées, etc.).

Cette étude prend en compte la règle des 3Rs :

Remplacement : A l'heure actuelle, il n'existe aucune méthode de substitution in vitro qui reproduise la complexité biologique du tractus digestif humain. La souris est un modèle de choix car elle présente un système de digestion et d'absorption proche de celui de l'homme. Ainsi, Le recours au modèle animal demeure la meilleure approche pour étudier la biodisponibilité des micronutriments liposolubles.

Réduction : Le nombre d'animaux utilisé dans cette étude est le minimum nécessaire pour assurer la validité statistique des phénomènes observés. L'étude des différentes conditions sera réalisée (ou non) en fonction des résultats préliminaires obtenus sur la lignée cellulaire intestinale humaine Caco-2. Pour chacune de ces conditions, et compte tenu de la variabilité interindividuelle existant chez la souris, des groupes de 6 individus seront utilisés.

Raffinement : Tous les actes invasifs seront réalisés sous anesthésie générale par sévoflurane. Les cages seront constituées de 3 à 4 animaux et l'environnement sera enrichi par l'ajout d'un igloo et de papier kraft tout au long de l'expérimentation. Les animaux auront accès ad libitum à la nourriture jusqu'à 4 heures avant le début de l'expérimentation et à l'eau jusqu'à la fin de l'expérimentation. Un délai minimum de 7 jours d'acclimatation des souris sera respecté.

10033 Notre sujet de recherche est orienté vers l'étude des mécanismes moléculaires contrôlant le développement du cortex cérébral et, lorsqu'ils sont perturbés, sont à l'origine de maladies neuro-développementales chez l'homme. En particulier, l'objectif principal de notre travail est de mieux comprendre le rôle du centrosome au cours de ce processus complexe de développement. Le centrosome est une organelle clé de la cellule car il participe grandement à l'établissement et au maintien de la morphologie cellulaire et à l'organisation intracellulaire des autres composants de la cellule. Des mutations dans des gènes codant pour des protéines centrosomales sont associées à des pathologies du système nerveux tel que l'épilepsie ou la microcéphalie. Ici, nous souhaitons comprendre comment cet organe régule le développement du cortex et pourquoi le cerveau est si sensible à des défauts de composition du centrosome. Ainsi, nous pourrions améliorer notre compréhension des mécanismes soutenant l'apparition dans ces maladies chez l'homme.

Le développement du cortex a été bien décrit chez les mammifères et est très proche du développement humain. Dès lors, ce modèle est le plus adapté pour répondre à notre question biologique. De plus, aucun modèle d'expérimentation in vitro ne peut mimer ou refléter toute la complexité des phénomènes ayant lieu dans le cortex en développement, tels que la prolifération des progéniteurs neuronaux, la migration et la différenciation neuronales.

Nous analysons le rôle de nos gènes d'intérêt pendant les stades de développement embryonnaire du cerveau grâce à des approches génétiques visant à modifier l'expression ou la fonction des protéines étudiées. Pour cela, nous avons besoin de transférer de l'ADN plasmidique non pathogène par un protocole d'injection/électroporation in utero dans le système nerveux central d'embryons de souris gestante anesthésiées. En euthanasiant les animaux à différents temps de la gestation, nous pouvons étudier les conséquences cellulaires de ces modifications génétiques sur les différentes phases du développement du cerveau.

Le nombre total de souris gestantes utilisées pour ce projet est estimé à 464 femelles gestantes correspondant à environ 4000 embryons manipulés. Le nombre de souris utilisées est justifié par

l'étude des conséquences de la perte de fonction et de la surexpression des formées mutées des gènes d'intérêts (6 conditions au total- 4 gènes d'intérêt) à différents stades du développement (2 stades embryonnaires et 2 stages post-nataux).

L'utilisation de l'expérimentation animale pour nos travaux est rendue nécessaire par la complexité de l'environnement cortical qui ne peut pas être recréé par des approches in vitro. Toutefois, nous garderons à l'esprit notre responsabilité de diminuer au maximum le nombre d'animaux expérimentés tout en atteignant la significativité statistique. Pour minimiser le nombre d'animaux utilisés, aucune nouvelle expérience ne sera effectuée avant qu'une analyse complète des précédentes ne soit réalisée.

Nous prendrons en compte avec la plus grande attention le bien-être de nos animaux. L'élevage et la reproduction de nos animaux se font dans un environnement contrôlé permettant une réduction du stress pour l'animal. Durant l'expérimentation les femelles gestantes sont anesthésiées par voie gazeuse (isoflurane). Nous limitons le temps de manipulation à 45 minutes sur l'animal anesthésié. Un anti-inflammatoire non-stéroïdien, le Metacam, est injecté avant l'opération par voie sous-cutanée. Le Metacam est également ajoutée au biberon pendant 2 jours après la chirurgie (2mg/kg dans l'eau de boisson). L'animal se réveille dans une cage chauffée à 35°C et est surveillé régulièrement. Nous vérifions que les animaux mangent et s'abreuvent normalement. Les jours suivants, les animaux sont surveillés deux fois par jour pour voir notamment si la plaie a besoin de soins et pour détecter d'éventuelles infections post-chirurgicales ou autres complications. L'objectif est de prévenir toute douleur ou détresse. En cas d'infections importantes ou de douleur manifeste, les animaux sont euthanasiés immédiatement par dislocation cervicale.

10034 Bien que peu fréquent (entre 0,1 et 1 événement pour 1000 plongées ; ≈400 cas/an en France), l'accident de décompression (ADD) se traduit par des symptômes pouvant aller de la simple démangeaison passagère au décès. 20 à 30% des plongeurs atteints d'ADD conservent une invalidité permanente. L'ADD représente ainsi le risque le plus grave chez les plongeurs subaquatiques professionnels et de loisir, mais concerne aussi l'ensemble des personnes exposées à des diminutions de pression importantes : patients et personnels des chambres hyperbares, pilotes (en cas de montée rapide en altitude), astronautes (lors des sorties spatiales extravéhiculaires), tunneliers. Il est admis que l'ADD est la conséquence de la formation de bulles dans la circulation sanguine pendant et après la décompression. Les paliers qu'effectuent les plongeurs lors du retour vers la surface visent à prévenir cet accident en diminuant la formation de bulles intravasculaires. Cependant, des ADD continuent d'être rapportés malgré le respect des procédures de décompression, soulignant l'intérêt d'améliorer la prévention et le traitement de cette pathologie.

Il est largement accepté que certains plongeurs sont plus sensibles que d'autres à l'ADD sans qu'on en connaisse encore l'origine, et que seule 13% de cette variabilité interindividuelle est expliquée par la formation des bulles intravasculaires. La capacité des bulles à générer un ADD serait donc dépendante de l'intervention de facteurs individuels, qui restent à découvrir. En utilisant un modèle murin, notre équipe a montré qu'il est possible de diviser par 3 la proportion d'ADD par un programme d'élevage sélectif des individus résistants. Outre la mise en évidence d'une part héréditaire de cette résistance, ce programme a montré qu'il est possible de créer un modèle murin de résistance à l'ADD, indispensable pour mieux en cerner les mécanismes physiopathologiques. L'objectif de ce projet est donc (i) : de poursuivre le programme de sélection pour aboutir à une souche murine stabilisée et (ii) : identifier les caractéristiques individuelles (physiologiques et génétiques) associées à cette résistance.

Dans ce but, des rats seront soumis à des plongées fictives en chambre hyperbare. Les individus résistants à l'ADD seront alors sélectionnés pour la reproduction afin de maintenir une lignée spécifiquement résistante à celui-ci. Après sevrage de leurs descendants, les parents résistants à l'ADD seront euthanasiés pour réaliser des analyses physiologiques et génétiques. Celles-ci permettront une meilleure compréhension des mécanismes de l'ADD ainsi que la possibilité d'identifier des individus résistants (ou susceptibles) à l'ADD.

Environ 1980 rats issus du protocole de sélection (180 animaux par génération, pendant les générations G10 à G20), seront utilisés dans le cadre de la procédure constituant ce travail scientifique. Conformément à la règle des 3R,

- remplacement : le remplacement n'est pas possible ici puisque notre objectif est de stabiliser la souche murine résistante à l'ADD et d'obtenir un modèle d'ADD.
- réduction : Le nombre d'animaux utilisés est réduit au minimum en limitant à la fois l'effectif de chaque génération et le nombre de générations (minimum nécessaire pour permettre la sélection d'un trait phénotypique complexe).
- raffinement : après une plongée, l'ADD est induit ou pas. Lorsqu'il apparaît chez l'animal, notre expérience nous a permis de déterminer des points limites prédictifs et fiables dans les 10 premières minutes qui suivent l'ADD, ce qui limite la souffrance des animaux.

10035 Des études antérieures chez des rats diabétiques induits par streptozotocine ont montré une réduction de l'hyperglycémie par administration orale pendant 21 jours d'extraits organiques des feuilles de *Cassia siamea*. Cependant, les mécanismes d'action et les molécules impliquées restent inconnus. Il est aussi connu que l'obésité constitue un facteur de risque important du diabète de type 2 (DT2). Nous nous intéressons donc à des modèles expérimentaux DT2 en rapport avec l'obésité.

Le but étant d'identifier les effets de *Cassia siamea* sur la glycémie, le profil lipidique, le stockage des lipides, le stress oxydant, l'inflammation et les complications cardiovasculaires du DT2 tels que la dysfonction endothéliale. Les interprétations de nos résultats nous permettront de comprendre certains aspects des mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans des effets antidiabétiques observés au cours des travaux de recherches précédents.

Nous étudierons *in vivo* les effets de l'extrait de *Cassia Siamea* sur des modèles diabétiques tels que les souris Ob/Ob. Parmi les différents modèles disponibles à ce jour, le modèle de souris Ob/Ob apparaît comme étant le plus pertinent. Nous allons également évaluer les effets des extraits sur des souris témoin qui recevront les mêmes procédures expérimentales afin d'obtenir des contrôles non obèses et non diabétiques.

Ainsi, l'extrait de *Cassia siamea* sera administré par gavage à des souris obèses et non obèses. On déterminera les effets de l'extrait sur le poids, la tolérance au glucose et à l'insuline. A partir du sang nous effectuerons des centrifugations pour l'obtention du plasma afin de réaliser la mesure de paramètres métaboliques (glucose, cholestérol, triglycéride,). Sur les différents tissus et organes (tissus adipeux, foie, muscle, cœur, aorte, carotide, rate) prélevés sur animaux euthanasiés nous effectuerons une étude immunochimique et histomorphologique par des marquages sur des coupes, des western blot ou des RT-PCR.

Tout au long de l'étude, nous veillerons à respecter la règle des 3R. Cette étude a un caractère de stricte nécessité et ne peut pas être remplacée par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants et susceptibles d'apporter le même niveau d'information. Ainsi, le nombre d'animaux à utiliser a été restreint à son minimum sans compromettre les objectifs du projet et l'interprétation statistique des résultats. Nous allons comparer les résultats obtenus avec un modèle statistique classique tel que l'analyse de la variance. Pour ce faire les moyennes des différents résultats seront comparées. Cent vingt (120) souris obèses et 120 souris non obèses (C57Bl/6J), soient 240 animaux au total seront utilisées.

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. De plus, pendant les différentes procédures expérimentales, le recours aux anesthésiants et au renforcement positif (l'entraînement à la coopération) sera primordial pour soulager l'inconfort, la douleur et la détresse des animaux.

Les animaux seront surveillés quotidiennement en termes d'aspect, de prise alimentaire et de vitalité. Une grille présentant les points limites sera utilisée pour déterminer la conduite à tenir.

Une telle étude nous permettra de mieux comprendre le rôle de *Cassia siamea* dans le traitement du diabète et des complications métaboliques associées.

10036 Les chats peuvent souffrir de nombreuses pathologies (insuffisances rénales ou pancréatiques) ou traumatisme (fractures osseuses, lésion articulaire, lésions cutanées) impactant leur bien-être au quotidien. Les traitements pour ce genre d'atteinte sont difficiles à mettre en place sur cette espèce et les résultats peuvent être limités. Dans ce contexte, la thérapie cellulaire apporte beaucoup d'espoir, et les cellules souches sont envisagées comme un outil particulièrement prometteur.

Toutefois, le type de cellules souches utilisées est remis en question. Celles originaires de la moelle osseuse ou du tissu adipeux sont les plus utilisées. Pour les premières, le prélèvement est complexe et douloureux, pour une collecte d'une faible quantité de cellules. Pour les deuxièmes, bien que le prélèvement soit plus simple et relativement indolore, il permet de collecter peu de cellules souches qui sont directement réinjectées au niveau de la lésion après un tri sommaire. Il en résulte que peu de cellules sont finalement injectées.

Récemment, il a été mis en évidence des cellules souches au sein de la muqueuse olfactive de plusieurs mammifères. Ces dernières ont démontré un potentiel thérapeutique dans le cadre de pathologies cérébrales et ostéoarticulaires dans différentes espèces; mais il n'existe pas de techniques publiées permettant le prélèvement de ces cellules chez le chat. La présente étude vise à développer une technique sûre et sans effet secondaire pour prélever des cellules souches dans la cavité nasale en vue de les comparer aux cellules déjà mises en évidence chez de nombreuses espèces.

A terme, la réalisation de ce projet permettrait le développement d'essais pour évaluer le potentiel thérapeutique de ces cellules chez le chat. Cela permettrait d'une part le développement de nouvelles thérapies visant à améliorer la médecine vétérinaire chez le chat pour améliorer leur bien-être et d'autre part de mener des études expérimentales chez une espèce présentant une de forte similitudes avec la population humaine (hétérogénéité, environnement de vie similaire, pathologies similaires).

Pour mener à bien ce projet, nous envisageons d'inclure 5 chats. Le nombre d'animaux inclus dans l'étude est réduit au maximum, tout en disposant de groupes suffisant pour obtenir des résultats exploitables. Afin de s'assurer du bien-être des animaux durant l'ensemble du projet ceux-ci seront suivis quotidiennement par un vétérinaire et une équipe animalière. L'ensemble des procédures d'opérations se déroulera sous anesthésie générale et en présence d'antidouleur. Afin de limiter les opérations sur les animaux, le projet sera réalisé sur une population devant être anesthésiée pour raison sanitaire (castration).

Ce projet apportera des informations pouvant aboutir à l'amélioration de la qualité de vie de l'ensemble de la population félines et sur des solutions thérapeutiques envisageables pour lutter contre des atteintes qui sont courantes chez l'homme, ainsi que d'autres espèces.

10037 Le bar commun (*Dicentrarchus labrax*) est l'une des principales espèces de poisson marin d'intérêt aquacole en Europe. De nombreux travaux scientifiques ont été conduits afin d'optimiser la productivité des fermes d'élevages de bar. Une attention particulière a été portée aux apports alimentaires nécessaires en protéines, en lipides mais également en acides gras à longues chaînes polyinsaturés (AGLPI) présents dans les huiles et farines de poissons afin d'optimiser les performances de croissance. En effet, les lipides alimentaires sont une source essentielle en énergie tandis que les AGLPI sont des acides gras impliqués dans de nombreuses fonctions biologiques telles que la réponse immunitaire et le système cardio-vasculaire du poisson. Par ailleurs, il a été rapporté qu'au cours de la période estivale, une hausse de la température de l'eau associée aux fortes densités de poissons en cage, conduit à une diminution importante de l'oxygène dissous dans l'eau, appelée hypoxie. Ces conditions défavorables conduisent à une diminution de la prise alimentaire et un affaiblissement général de l'état de santé du poisson, le rendant vulnérable à la présence d'agents pathogènes opportunistes présents dans l'environnement aquatique. L'objectif principal de ce projet est de déterminer quelles sont les compositions alimentaires optimales en lipides et AGLPI afin d'améliorer la résistance du bar vis-à-vis d'agents pathogènes lors de ces événements critiques.

Pour ce faire, 1980 juvéniles de bar seront utilisés pour réaliser la procédure expérimentale. Les poissons seront conditionnés à six aliments différents caractérisés par des compositions variables en lipides et AGLPI pendant deux mois, puis soumis à un stress hypoxique chronique (diminution

modérée du taux d'oxygène dissous dans l'eau) pendant un mois, mimant les conditions défavorables observées en cage lors des périodes estivales. Un sous-groupe de 80 poissons par traitement alimentaire sera également soumis à un stress hypoxique aigu ponctuel non léthal, correspondant à une diminution progressive de l'oxygène jusqu'à ce que les poissons perdent leur équilibre de nage; ces poissons seront donc caractérisés en fonction de leur capacité individuelle à résister à l'hypoxie. Ensuite, le potentiel global de défense de tous les poissons sera évalué après une épreuve virale expérimentale au Virus de l'Encéphalopathie et de la Rétinopathie (VER). La procédure sera menée dans le respect de la règle des 3R, à savoir tout d'abord le remplacement n'est pas envisageable ; l'utilisation du bar étant nécessaire puisqu'aucune méthode alternative n'a encore été développée pour examiner de manière globale l'état de santé. 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, oxygénation suffisante, rythme jour/nuit naturel, présence de suffisamment de congénères pour exprimer un répertoire comportemental riche). Suite à l'épreuve infectieuse, le suivi de la mortalité et l'analyse d'échantillons de sang prélevés sur les survivants permettront d'obtenir une caractérisation complète des effets bénéfiques possibles des six aliments sur la santé du poisson.

10038 Les écosystèmes d'eau douces sont soumis à de nombreuses contraintes environnementales, d'origine naturelle ou anthropique, de nature très diverse (changement de température, modifications hydrodynamiques, composition physico-chimique, etc.). Ces différentes contraintes vont particulièrement impacter les organismes vivant dans cet écosystème. Les poissons d'eau douce sont directement affectés par ces modifications environnementales, en terme de populations, de nombre d'espèce, mais également au niveau individuel. En effet, de nombreuses études cherchent à évaluer les conséquences de la pression environnementale au niveau populationnel (suivis de population, estimation de la biomasse, etc.) mais au final, relativement peu de recherches sont menées sur les conséquences directes au niveau individuel, et la plupart sont réalisées sur les salmonidés (truite et saumon). Le projet qui suit, s'intéresse de fait, à pallier ce manque d'informations en étudiant différents modèles de poissons d'eau douce. Afin de ne pas impacter la faune sauvage, les espèces modèles que sont le poisson-zèbre (*Danio rerio*) et le poisson rouge (*Carassius auratus*) seront utilisées dans un premier temps, pour profiter de l'énorme somme de connaissances déjà acquise sur ces organismes. Le but de ce projet est donc de caractériser les conséquences de différentes contraintes environnementales sur les paramètres physiologiques des poissons d'eau douce et plus particulièrement étudier les relations entre performances musculaires *in vivo* (nage, métabolisme) et les capacités bioénergétiques cellulaires (respiration et efficacité mitochondriale) de chaque espèce. Au niveau expérimental, l'étude va porter sur des contraintes abiotiques naturellement rencontrées telles que 1) les variations de concentration en oxygène (hypoxie chronique et aiguë) ou 2) en ions (régulation osmotique), ou liées plus directement à l'anthropisation, telles que 3) les variations d'intensité lumineuse (1 lux, 20 lux ou 500 lux). Un effectif total de 380 poissons (220 poissons rouges et 160 poissons zèbres) est nécessaire et suffisant pour permettre d'obtenir des résultats scientifiquement robustes. Le nombre de poissons de chaque espèce varie car les 2 espèces ne seront pas soumises à chaque condition. Chaque groupe expérimental sera cependant composé de 20 poissons, nombre d'individus minimum pour s'affranchir de la variabilité interindividuelle, relativement importante notamment au niveau des performances de nage. Que ce soit la partie *in vivo*, via l'utilisation de tunnels de nage homologués, ou les mesures *in vitro*, l'ensemble des procédures seront réalisés grâce à du matériel de pointe récemment acquis par le laboratoire. Les protocoles suivent la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner) : - Remplacer : Ces études, qui visent à relier métabolisme énergétique *in vivo* et *in vitro*, doivent être réalisés sur des animaux. - Réduire : le nombre d'individus utilisé a été réduit au minimum afin de permettre d'obtenir des résultats statistiquement appropriés aux objectifs. - Raffiner : Les différents protocoles (métabolisme *in vivo*, performances de nage et bioénergétique cellulaire) sont bien établis chez les poissons et maîtrisés au laboratoire. L'objectif des protocoles est de limiter au minimum la souffrance et le stress des animaux. Chaque geste contraignant (mesure et placement des poissons dans les tunnels de nage) sera réalisé anesthésie légère, suivi

par un temps d'acclimatation de 12h. Les poissons seront à l'abri de toute nuisance visuelle et sonore pendant la récupération et les expériences. Cela permet d'obtenir des mesures physiologiques valides et fiables, qui ne sont pas influencées par un état de souffrance, stress ou agitation de l'animal. Au niveau des expériences de bioénergétique, les individus seront euthanasiés selon la méthode préconisée. Une attention particulière sera portée sur les poissons non euthanasiés qui seront replacés après validation par les services vétérinaires.

10039 Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), les anomalies congénitales sont définies comme des anomalies de développement qui surviennent durant la vie intra-utérine et qui peuvent être identifiées avant la naissance, à la naissance ou plus tard dans la vie. On estime, que chaque année, 276 000 nouveau-nés meurent avant l'âge de 28 jours à cause d'anomalies congénitales. Outre les facteurs socio-économiques, les facteurs génétiques restent la cause majeure des anomalies congénitales, il est donc important de connaître la fonction des gènes qui sont impliqués. De par sa petite taille, ses nombreuses ressemblances génétiques avec l'Homme, et les facilités de modification de l'ensemble de ses gènes, la souris est un excellent modèle pour comprendre les maladies humaines. Pour comprendre la fonction d'un gène chez la souris, on peut supprimer ce gène et observer les conséquences anatomiques, physiologiques et comportementales. C'est ce que fait un projet international auquel nous participons, et les résultats montrent que 30 à 40 % des gènes de la souris ont un rôle dans la survie des animaux in utero ou peu après la naissance. En conséquence, une stratégie a été mise en place par les acteurs de ce projet. Elle prévoit l'analyse des souris génétiquement modifiées à différents stades de développement qui sont clés pour la survie (par exemple, la formation du système cardiovasculaire ou l'adaptation à la vie extra-utérine) permettant alors d'obtenir le maximum de résultats scientifiques pour comprendre leurs fonctions. Au sein de notre institut, 67 gènes qui ont été invalidés dans le cadre de ce projet international montrent une létalité in utero ou peu après la naissance. Nous estimons qu'une dizaine de projets avec des gènes encore inconnus provenant de demandes académiques ou industrielles pourraient se rajouter à ces 67 gènes ce qui fait 77 gènes au total à caractériser, soit 77 lignées de souris génétiquement modifiées. En fonction de statistiques déjà réalisées dans des études précédentes, on estime à 1860, le nombre de fœtus nécessaires pour cette étude.

Remplacement : Compte tenu de l'objectif de l'étude, il est impossible de remplacer le modèle animal par un modèle in vitro.

Réduction : Cette stratégie permet de réduire le nombre d'animaux utilisés car les stades sont choisis à des moments clés pour la survie et permettent d'éviter la dissection au hasard afin de déterminer le stade de létalité. Nous suivons aussi la gestation des femelles grâce à un examen échographique, et cela permet d'euthanasier uniquement les femelles dont nous avons besoin c'est-à-dire gestantes et pas des non gestantes (car à des stades embryonnaires précoces, la détermination de la gestation par palpation est sans garantie).

Raffinement : Tout est mis en œuvre pour le bien-être des animaux, la surveillance de l'état de santé et des actions appropriées sont réalisées à l'animalerie si nécessaires (soins, analgésie, etc.). Une attention particulière sera aussi appliquée lors des tests de viabilité sur les fœtus qui ne dépasseront jamais une heure.

10040 Les traumatismes de la moelle épinière peuvent interrompre la commande nerveuse des muscles squelettiques. A ce jour, aucun traitement n'est disponible chez les patients victimes de troubles de l'activité motrice en dehors de soins palliatifs. L'étude de la physiologie musculaire intégrée nécessite l'utilisation d'animaux vivants. Pour étudier les mécanismes impliqués dans une éventuelle restauration de l'activité motrice, notre équipe a développé un modèle préclinique d'insuffisance locomotrice chez la souris. Un acteur probablement impliqué dans cette récupération est le facteur de transcription Nrf2. Nous planifions de moduler cette voie de signalisation par l'application d'un traitement de 6 semaines d'exercice physique modéré.

Dans le respect de la règle des 3R (remplacement, réduction, raffinement), nous utiliserons un nombre adéquat de sujets génétiquement modifiés (KO Nrf2) et sauvages, soit au total 156 souris, afin d'évaluer l'implication de cette protéine dans la récupération motrice suite à un traitement de 6 semaines d'exercice physique modéré. Pour limiter la souffrance en postopératoire, les animaux

reçoivent des antidouleurs, ainsi qu'un suivi et une évaluation quotidienne selon la grille de Morton et Griffiths adaptée à nos besoins. Une attention particulière sur la perte éventuelle de poids de l'animal en postopératoire sera effectuée. Ce projet permettra de mettre au point des protocoles thérapeutiques innovants et non-invasifs du traitement de l'insuffisance motrice consécutive à une lésion spinale.

10041 Le pseudoxanthome élastique (PXE) est une maladie génétique rare provoquant une calcification de la peau, des yeux et des artères qui est due à la mutation du gène qui code pour le transporteur ABCC6 principalement exprimé dans le foie et dans une moindre mesure les reins. Les patients atteints de PXE présentent un risque accru d'accidents vasculaires ischémiques. Cependant, l'étiologie de la maladie artérielle associée au PXE reste mal comprise. Les premières investigations chez les patients PXE suggèrent qu'une hyperactivation des plaquettes sanguines soit à l'origine d'une thrombose artérielle. En effet c'est l'accumulation des plaquettes qui mène à l'occlusion des artères dans le contexte des maladies vasculaires ischémiques graves comme l'accident vasculaire cérébral ou l'infarctus du myocarde, qui représentent par ailleurs la première cause de mortalité dans le monde.

La souris *Abcc6*^{-/-} est un bon modèle génétique pour l'étude de la maladie humaine car elle reproduit l'essentiel des manifestations physiopathologiques du PXE (calcifications, marqueurs biologiques, atteinte oculaire, etc.). Le travail a pour objectif d'évaluer l'hémostase et la thrombose chez la souris *Abcc6*^{-/-}, il consistera à :

- i) prélever le sang de souris pour étudier les plaquettes in vitro (morphologie, fonction)
- ii) soumettre les souris *Abcc6*^{-/-} à une thrombose expérimentale in vivo
- iii) évaluer la durée de vie plaquettaire in vivo après leur marquage spécifique

L'ensemble de nos investigations nécessitera 102 souris. Une attention particulière est portée à la réduction des animaux, au raffinement des procédures et au remplacement de l'animal pour ce projet.

Remplacement :

De nombreuses expériences nécessaires à la compréhension de cette maladie ont pu être réalisées avec du sang de patients volontaires pour faire avancer ces recherches. Dans le cas de cette saisine, les expériences sur l'animal ne peuvent être substituées et ont été réduites au maximum.

Réduction :

Les effectifs des animaux impliqués dans cette étude ont été réduits au minimum en s'appuyant sur des données précédentes. Le nombre d'animaux choisi permettra d'analyser les résultats de manière statistique avec un test de Mann Whitney.

Raffinement :

Les animaux sont hébergés dans des cages enrichies avec du coton compressé et de la frisure pour permettre aux souris de construire leurs nids. Elles pourront ainsi compartimenter leur environnement selon leurs besoins. Les animaux sont mis entre 2 et 6 par cage afin de concilier leurs besoins sociaux et la réduction de la fréquence des changes avec le stress y afférant. Ils ont un accès permanent à l'eau de boisson et à la nourriture. L'enrichissement des animaux en cours de protocole est augmenté de coton cardé afin de leur fournir un nid plus chaud. Toutes les procédures seront faites avec des animaux anesthésiés et traités contre la douleur.

10042 Notre laboratoire entretient, depuis 1978, un troupeau reproducteur de canards de barbarie de haut statut sanitaire dans le but de produire des œufs exempts d'organismes pathogènes spécifiés (EOPS). Les œufs produits sont utilisés dans les analyses virologiques du laboratoire (pour des maladies réglementées comme la grippe aviaire en tant que laboratoire national de référence) ou sont éclos pour être utilisés en expérimentation animale. Ils constituent la base de nos modèles expérimentaux. Les objectifs du projet sont donc de maintenir ce troupeau considéré comme fournisseur d'animaux utilisés en expérimentation animale.

Un lot de canards est constitué de 40 femelles et 15 mâles, vivant ensemble, la reproduction s'effectuant par voie naturelle. Ce nombre d'animaux correspond à l'effectif nécessaire aux besoins du laboratoire et pour limiter la consanguinité (effets néfastes provenant du fait que deux individus ont un ancêtre commun). Pendant qu'il y a un lot en ponte (40 femelles et 15 mâles), un autre est

en phase d'élevage (60 femelles et 25 mâles). Le troupeau est donc constitué de deux lots, un en ponte et le second en phase d'élevage.

Pour les 5 années du projet, le nombre d'animaux est estimé à 700 (100 femelles et 40 mâles par an).

Les animaux sont élevés dans un environnement enrichi (caillebotis plastique au sol avec une partie litière en copeaux de bois, abreuvoirs permettant de plonger la tête et le cou pour se mouiller une partie du corps) et en ayant des contacts avec leurs congénères (élevage en groupe).

La vérification du statut EOPS nécessite des contrôles sanitaires réguliers vis-à-vis des pathogènes majeurs du canard, pouvant être des virus, des bactéries ou des mycoplasmes, notamment au travers de prélèvements sérologiques. A 10 semaines d'âge puis à 19, 27, 37, 47, 57 et 67 semaines d'âge. A 10 et 37 semaines d'âge, l'ensemble des animaux sont prélevés alors que pour les autres dates, seuls 15 femelles et 5 mâles le sont.

10043 Les anticoagulants sont recommandés pour la prévention et le traitement de la maladie thrombo-embolique veineuse (TEV) et la prévention des événements thrombo-emboliques chez les patients souffrant de fibrillation auriculaire (FA) et de syndrome coronaire aiguë (SCA). Les options thérapeutiques disponibles comptent, entre autres, les antagonistes de la vitamine K (AVK), et une catégorie nouvellement apparue d'inhibiteurs directs du FXa (i.e. Rivaroxaban). La combinaison des anticoagulants oraux avec les traitements antiplaquettaires dans la prévention secondaire après SCA apporte un bénéfice, cependant au prix d'une augmentation importante du risque d'événements hémorragiques majeurs.

Ce projet a pour objectif d'évaluer les effets relatifs des anticoagulants oraux en association ou non avec les traitements antiplaquettaires sur les fonctions plaquettaires. Avec comme hypothèse de travail que le traitement par anticoagulants oraux en monothérapie pourrait prévenir le risque thrombotique sans effet délétère sur le risque hémorragique.

Pour se rapprocher de la pathologie humaine, nous utiliserons un modèle de thrombose artérielle chez la souris et nous déterminerons si les différents anticoagulants oraux affectent l'adhésion et l'agrégation plaquettaire et le dépôt de fibrine au niveau du site de lésion vasculaire.

Remplacer : Dans la mesure du possible, les expériences in vivo sur souris seront remplacées par des études in vitro sur cellules.

Réduire : Le nombre d'animaux utilisés lors des expériences sera réduit au minimum nécessaire, avec la contrainte d'obtenir des données statistiquement significatives. Il a été estimé en prenant en compte les paramètres suivants : l'hypothèse est que le traitement est efficace s'il augmente le temps d'occlusion de 50% ou le temps de saignement jusqu'à 600 s; un risque alpha fixé à 5% et un risque beta (puissance) à 80%.

Raffiner : Afin de limiter l'angoisse, l'inconfort, le stress et la douleur associés, les expériences sont raffinées. La grande pratique des expérimentateurs permet de diminuer le temps de manipulation et donc le stress lors de la procédure 1. La procédure 2 sera réalisée sur des animaux anesthésiés. La souris étant un animal social, les animaux seront hébergés par groupe de 3 ou 4 souris par cage. L'établissement utilisateur a mis en place un enrichissement qui consiste en la présence d'un igloo en polycarbonate et de fibres de calage en carton.

L'ensemble des expériences décrites dans ce document nécessitera 198 souris.

10044 La polyarthrite rhumatoïde est une maladie inflammatoire auto-immune qui touche les articulations. Elle est caractérisée par une hyperplasie et une infiltration synoviales, suivie d'une destruction osseuse et cartilagineuse, entraînant un handicap.

Methotrexate est le médicament recommandé pour être utilisé en première ligne pour les patientes atteintes de polyarthrite rhumatoïde. Malheureusement, il y a une grande variabilité d'une personne à l'autre dans la réponse à la Methotrexate. Environ 50% des patients ont une faible réponse, voir pas de réponse au traitement. Les mêmes constants ont été faits pour la thérapie avec les inhibiteurs de TNF (tumor necrosis factor), ils ne sont pas efficaces chez tous les patients. C'est pourquoi, les recherches continuent pour obtenir, des médicaments plus efficaces, mieux ciblés, avec moins d'effets secondaires pour les patients. L'objectif de notre projet est d'évaluer l'activité anti-inflammatoire de produits pharmacologiques dans un modèle de polyarthrite rhumatoïde chez

la souris. Les molécules étudiées auront été sélectionnées pour leurs propriétés anti-inflammatoires, dans des tests cellulaires adaptés.

Adéquation avec la règle des 3R

Remplacer

Dans un premier temps, les différentes molécules candidates sont évaluées in vitro, pour leur activité anti-inflammatoire. Cette étape permet d'éliminer les composés inactifs. Ensuite les molécules actives in vitro vont subir une série de tests in vitro pour mettre en évidence l'absence de toxicité. Ainsi seules les molécules montrant une efficacité et une innocuité in vitro seront évaluées in vivo. On ne peut pour l'instant pas remplacer cette dernière étape étant donné qu'il est impossible de restituer actuellement la complexité du vivant dans les modèles in vitro.

Réduire

En accord avec les publications scientifiques et selon des contraintes statistiques nous réalisons notre étude avec des groupes de 8 souris.

Il est prévu d'évaluer l'activité de 1 candidat médicament par an à 3 doses. En incluant dans l'étude un groupe contrôle traité par le solvant seul. Ainsi qu'un groupe contrôle positif (médicament de référence approuvé). Pour réaliser l'étude sur 5 ans, un total de 1340 souris est nécessaire.

Raffiner

Seules les molécules présentant le meilleur rapport efficacité/innocuité in vitro seront étudiées in vivo.

Avant de démarrer le protocole in vivo nous faisons une série de vérifications pour s'assurer que le produit administré présente le profil réglementaire (choix de solvant, pH) pour être administré à l'animal par voie orale. De plus, seuls les composés biodisponibles, vont faire l'objet d'une étude d'efficacité.

Nous faisons également une étude préalable, pour déterminer les doses administrées ne présentant aucun effet indésirable pour l'animale.

Le bien-être des animaux sera pris en compte tout au long de l'étude, avec un suivi journalier de l'état général des animaux. Et une mesure du poids de l'animal une fois par semaine.

Les souris seront maintenues durant une période d'acclimatation d'une semaine pour une habitude à leur nouvelle condition d'hébergement avant de commencer l'étude.

Le protocole expérimental prend en compte l'impact potentiel sur la souffrance animale et différents critères ont été établis pour justifier l'arrêt de l'expérience en cours. Si une souris présente des signes traduisant l'apparition de mal être, la souris va être immédiatement euthanasié.

10045 Il est reconnu que les porcs peuvent être sujets à l'hyperthermie maligne. Cette pathologie est caractérisée, chez les individus sensibles, par des contractures intenses des muscles squelettiques avec de l'acidose métabolique et une élévation de la température corporelle suivie d'une mort rapide. Ce syndrome est provoqué par des stimuli de stress variés, comme la manipulation et le transport mais également l'inhalation d'anesthésiques halogénés tels que le Vetflurane et l'Isoflurane.

Ce syndrome mortel a une hérédité autosomique récessive et est dû à une mutation ponctuelle du gène Ryr1, située sur le chromosome 6.

La fréquence des animaux susceptibles de déclarer une hyperthermie maligne varie en fonction des races, elle est d'environ 46% chez le porc large white. Cette race de porc est fréquemment utilisée dans des protocoles nécessitant une anesthésie générale sous Vetflurane. Nous souhaitons donc mettre en place une procédure de génotypage afin d'identifier les animaux porteurs de deux allèles mutés du gène Ryr1. Ces animaux, porteurs la mutation, seront dès lors écartés des protocoles nécessitant une anesthésie sous Vetflurane afin d'éviter qu'ils décèdent pendant l'anesthésie, d'une hyperthermie maligne.

Le nombre maximal de porcs qui seront génotypés sur un an sera de 173. Les projets de recherche qui utiliseront ces animaux ont pour objectifs d'évaluer l'efficacité de médicaments à visée humaine, dans un contexte de pathologies respiratoires

Ce nombre a été déterminé de façon à respecter la règle des 3R

Remplacer : le modèle porc est judicieusement utilisé dans des protocoles de recherche, souvent en complément d'études in vitro qui ne permettent pas de modéliser un organisme entier (par exemple réponse et devenir dans l'organisme d'une molécule thérapeutique).

Réduire : le nombre de porcs a été déterminé afin de sélectionner un nombre d'individus nécessaire pour mener à bien des études nécessitant 35 animaux sur 1 an. Ce projet va bien dans le sens d'une réduction dans la mesure où son objectif est de sélectionner les animaux (donc d'en réduire le nombre) qui pourront être soumis à des anesthésiques halogénés sans risque d'hyperthermie fatale.

Raffiner : Les animaux sont élevés ensemble (enrichissement social) dans un local adapté (conforme aux normes en vigueur) avec des ballons et chaînes.

10046 Depuis le 18^{ème} siècle on sait que l'électricité animale est responsable de toute manifestation de la vie chez les organismes multicellulaires. Cette électricité, à l'origine de la transmission nerveuse, de la contraction musculaire, de la sécrétion hormonale ou encore de la spontanéité du rythme cardiaque, est due à des déplacements de particules chargées (les ions) au travers de protéines situées dans les membranes des cellules. Parmi ces protéines, les canaux ioniques jouent un rôle central dans la régulation de cette électricité animale et permettent les échanges de ces ions selon un gradient électrochimique qui va caractériser le niveau d'activité de la cellule.

Il a été montré qu'un canal potassique à deux domaines pore, avait la capacité de laisser passer des ions sodium lorsqu'il était exposé à des conditions particulières. Ce changement de sélectivité ionique unique à ce canal, confère à ce dernier la particularité de passer d'un statut de canal Inhibiteur comme tous les canaux potassiques à celui d'un canal Excitateur.

Les raisons de cette propriété de sélectivité dynamique résident dans une singularité moléculaire impliquant des acides aminés uniques dans la structure de cette protéine. Ces acides aminés sont localisés dans des régions importantes de la protéine pour la sélectivité. Leur mutation permet soit d'établir une sélectivité exclusive pour le potassium soit, au contraire, de rendre ce canal toujours non sélectif.

Devant le développement rapide d'une pharmacologie à fort potentiel thérapeutique ciblant cette famille de canaux potassiques, il nous apparaît particulièrement intéressant et opportun de disposer de connaissances permettant de comprendre le rôle de ce canal dans les grandes fonctions physiologiques et notamment de comprendre l'intérêt de sa sélectivité particulière. L'objectif étant de pouvoir à terme envisager de jouer sur cette propriété singulière afin de développer de nouveaux médicaments plus performants et plus spécifiques. Pour cela il nous faut comprendre l'intérêt pour un organisme entier de disposer d'un canal ionique avec cette caractéristique. Pour cela, il est important de mesurer l'impact sur l'organisme lorsque ce canal se trouve dans une configuration purement sélective pour les ions potassium et lorsqu'il laisse passer aussi bien des ions potassium ou les ions sodium (non sélectif). Les propriétés de sélectivité du canal ont été démontrées in vitro sur des modèles cellulaires, mais compte tenu des implications possibles de ce canal dans des pathologies humaines, il est important d'évaluer in vivo les conséquences de cette sélectivité dynamique. C'est au niveau central que notre canal d'intérêt est le plus fortement représenté et notamment au niveau de structures impliquées dans la motricité (cervelet), l'apprentissage et la mémoire (hippocampe), la régulation de l'humeur et de la sensibilité (thalamus). C'est pourquoi le présent projet adresse les questions du rôle de la sélectivité dynamique du canal d'un point de vue comportemental chez la souris. Pour cela nous disposons de quatre lignées de souris génétiquement modifiée chez lesquelles notre canal d'intérêt présente différentes propriétés :

- toujours sélectif pour le potassium
- toujours non-sélectif (laissant passer aussi bien du sodium que du potassium)
- non actif (lignée Knock Out (chez laquelle le gène codant le canal a été invalidée))

Ces lignées seront comparées avec une lignée de souris normales dans différentes situations permettant d'évaluer les capacités d'apprentissages motrices et mémorielles, la dépression et la sensibilité douloureuse. Nous avons évalué à 400 le nombre d'animaux nécessaires à ce projet conçu en plaçant la démarche des 3R au cœur de notre réflexion.

Remplacement : nous avons d'ores et déjà élucidé in vitro les mécanismes qui sous-tendent l'hypothèse selon laquelle la sélectivité du canal peut modifier le potentiel de membrane d'une

cellule et ainsi influencer son niveau d'excitabilité. Cette hypothèse doit maintenant être validée 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 et cognitifs à l'œuvre d'un organisme entier. De par ses similarités avec la physiologie humaine et parce ce que nous possédons plusieurs modèles génétiquement modifiés nous permettant de détailler les fonctions du canal, la souris constitue le modèle le plus approprié.

Réduction : nous avons effectué une large recherche bibliographique afin de nous assurer de ne pas dupliquer des protocoles expérimentaux déjà réalisés. Cette recherche bibliographique nous a permis d'optimiser nos procédures et de définir le nombre minimum d'animaux nécessaire à l'obtention de résultats statistiquement significatifs et interprétables.

Raffinement : Nous mettrons en œuvre tous les éléments de raffinement nécessaires afin d'éviter toute souffrance ou angoisse aux animaux, notamment anesthésie/analgésie lorsque cela est requis. Des grilles de scores ont été définies pour évaluer le degré de gravité des procédures, établir des points limites et permettre leur mise en œuvre de manière précoces et adaptés.

10047 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 et constipation, seules ou en alternance). De plus, chez les patients, le stress aigu ou chronique est reconnu comme un important facteur de risque, impliqué dans l'initiation et l'aggravation des principaux symptômes. Bien que la prévalence du SII soit élevée, il n'existe à ce jour sur le marché aucun traitement pharmacologique satisfaisant ; ainsi, notre projet vise à évaluer l'efficacité de plusieurs souches probiotiques sur des modèles « SII-like » précliniques afin de développer de nouvelles pistes de traitement de cette pathologie. Pour cette étude d'une durée de 5 ans seront utilisés 2320 rats Wistar femelles adultes pour évaluer l'efficacité de 10 souches d'intérêt, administrées par gavage, sur l'hypersensibilité viscérale en condition de stress aigu. Les souches présentant des propriétés antidouleur viscérale optimales seront sélectionnées afin d'étudier leur(s) mécanisme(s) d'action.

L'utilisation du modèle rat se justifie par le nombre important d'études bibliographiques et d'outils méthodologiques utilisant ce modèle pour étudier la pathologie du SII qui de par sa complexité ne peut être reproduite sur des modèles in vitro.

Les animaux utilisés seront des animaux sains provenant d'un élevage agréé. Ils seront hébergés dans des conditions normalisées optimales et suivies quotidiennement pour leur apporter tous les soins nécessaires et leur assurer un haut niveau de bien-être. 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 optimisé en tenant compte de la variabilité interindividuelle ce 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 (période d'adaptation, récupération) et prévenir toute douleur ou anxiété susceptible d'être subie par les animaux (anesthésie, analgésie et soins post-opératoires). Si malgré les mesures prises, une souffrance était constatée, la procédure serait arrêtée.

10048 L'existence d'une communication entre microbiote, intestin et cerveau est aujourd'hui largement démontrée. Cet axe microbiote-intestin-cerveau module les comportements alimentaires (satiété, motivation alimentaire, etc.). L'implantation du microbiote intestinal, le développement des fonctions intestinales et des mécanismes centraux de régulation du comportement alimentaire se déroulent conjointement dès les premiers jours de vie post-natale. De nombreux travaux de recherche suggèrent un lien entre ces phénomènes et indiquent notamment que l'écosystème bactérien (composition et/ou métabolites) de l'intestin du nouveau-né pourrait influencer fortement la mise en place de ses fonctions centrales. De plus, l'alimentation joue un rôle majeur dans la mise en place du microbiote intestinal, et par conséquent pourrait influencer la neurogénèse et la fonctionnalité des structures cérébrales. Les formules infantiles ne parvenant pas à mimer tous les effets physiologiques du lait maternel, il est important de connaître les différences majeures en termes de

neurogénèse chez le nouveau-né allaité par sa mère ou recevant une formule infantile afin de proposer des pistes d'optimisation de la composition des formules infantiles.

Ce projet a pour objectif de déterminer comment la nature de l'alimentation proposée au nouveau-né dès sa naissance (allaitement maternel versus formule infantile) influence le développement post-natal des structures cérébrales qui régulent le comportement alimentaire et quel est le rôle du microbiote dans la communication intestin-cerveau.

Il comprend deux étapes.

L'étape 1 consistera à suivre des porcelets sur différents temps après la naissance. En comparant des animaux nourris par leur mère ou recevant des formules infantiles porcinisées (différentes par leur composition), nous pourrions étudier l'influence de l'alimentation du nouveau-né sur la dynamique de maturation de l'axe intestin-cerveau. Trente-six truies et leurs portées seront suivies (80 porcelets allaités par leur mère ou alimentés avec une formule infantile). Les porcelets recevant une formule infantile seront logés en cages individuelles. Des prélèvements de fèces seront réalisés régulièrement sur les animaux pour étudier le microbiote. Après euthanasie des porcelets à différents temps post-nataux, des tissus digestifs et du cerveau seront collectés.

L'étape 2 consistera en l'étude de marqueurs plasmatiques. Elle sera réalisée sur vingt porcelets répartis en deux groupes d'animaux (allaitement maternel vs une formule qui sera définie à l'issue de l'étape 1). Une à deux prises de sang seront réalisées à des âges dont la pertinence sera définie par les résultats de la première étape.

Le protocole a été élaboré dans le respect de la règle éthique des 3R : (1) Remplacer : le projet s'intéressant à des réponses physiologiques au niveau de l'intestin et du cerveau, l'utilisation d'un modèle animal vivant est indispensable. Le modèle animal choisi est le porcelet Yucatan, pour sa ressemblance d'un point de vue anatomique et physiologique avec le nouveau-né humain ; (2) Réduire : les effectifs (n=10 par groupe et âge) ont été fixés pour permettre une évaluation statistiquement significative des effets attendus (expression génique et analyse immunohistologique de plusieurs régions cérébrales dans l'étape 1 et marqueurs plasmatiques dans l'étape 2) ; (3) Raffiner : les compétences et expériences des expérimentateurs garantissent le respect du bien-être animal. Des points limites ont été établis, entraînant la sortie de protocole ou l'euthanasie anticipée de l'animal si nécessaire. De plus, l'éventuel stress engendré par l'isolement en cages individuelles sera minimisé par les interactions visuelles et auditives des animaux placés dans les mêmes salles.

10049 Les déficiences intellectuelles (DI), aussi appelées retards mentaux, apparaissent avant l'âge de 18 ans et sont définis par un quotient intellectuel en dessous de 70, associé à des difficultés d'adaptation à l'environnement et une incapacité à établir un raisonnement pour répondre à une situation nouvelle. En France, cette population est estimée entre 200 000 et 1 500 000. On distingue les causes génétiques et les facteurs environnementaux parmi les causes influençant le développement du système nerveux central.

De manière intéressante, il semblerait que certaines protéines impliquées dans les formes génétiques de DI soient enrichies au niveau des synapses des neurones et réguleraient ainsi le dialogue entre les neurones. Cela permettrait d'expliquer pourquoi, dans les DI, une altération du dialogue entre les neurones a été montrée. Plus récemment, il a été mis en évidence que ces protéines ne sont pas exprimées seulement au niveau des neurones mais aussi au niveau d'un autre type de cellules tout aussi abondant dans le cerveau : les astrocytes. Ces cellules sont connues pour être particulièrement importantes dans l'établissement et le maintien des connections entre les neurones. Ainsi, une meilleure compréhension du rôle de ces protéines dans les différents types cellulaires et la caractérisation des voies de signalisation auxquelles elles participent pourraient avoir des applications à visées thérapeutiques.

Nous nous focaliserons dans ce projet sur une de ces protéines, l'Oligophérine 1 (OPHN1). Des données récentes réalisées *in vitro* ont en effet mis en évidence que la perte de fonction de cette protéine dans des astrocytes induit un changement global des propriétés de ces astrocytes. Cette découverte pourrait donc suggérer que l'établissement et le maintien des connections entre les neurones sont détériorés au sein des différentes structures corticales.

L'étude présente s'intéressera justement au rôle de cette protéine dans les interactions complexes entre les astrocytes et les neurones. Nous nous intéresserons à une structure corticale de référence, l'hippocampe, qui joue un rôle crucial dans la mémoire et dans laquelle une abondante littérature existe sur le rôle des astrocytes dans la communication neuronale. Ces expériences ne peuvent pas être réalisées *in vitro* car ces voies de signalisation complexes doivent rester intactes. Pour ce faire, 320 souris seront utilisées sur 5 ans. Ce nombre a été rationalisé à partir de statistiques de puissance. L'ensemble des expériences sera effectué par des personnes habilitées tout en respectant le bien-être animal en veillant en particulier à supprimer toute forme de douleur. Grâce à cette étude systématique et complète de la cellule à l'animal, nous espérons découvrir de nouvelles approches thérapeutiques ciblant les astrocytes pour améliorer les capacités cognitives des patients.

10050 Les déficiences intellectuelles (DI) correspondent à un arrêt total ou partiel du développement mental apparaissant avant l'âge adulte et affectant les fonctions cognitives tel que l'apprentissage, la mémoire, le langage, mais aussi la motricité et les habiletés sociales. Les DI entraînent une perte d'autonomie importante avec des conséquences pour les familles et la société. Les DI sont des maladies neuro-développementales touchant 1 à 3% de la population mondiale. En France, plus de 650 000 personnes souffrent de DI, comme dans les cas de trisomie 21 ou d'autisme.

Le projet de notre équipe a pour but de comprendre les mécanismes physiopathologiques des DI associées à des changements du nombre de copies, comme dans le cas de la trisomie 21, ou à des mutations de gènes associés à des retards mentaux. Ici, nous nous intéressons plus particulièrement au gène de la calpaïne 10 (CAPN10). Des mutations de ce gène ont été retrouvées chez des patients atteints de microcéphalie et de DI. Le rôle de la calpaïne 10 (CAPN10) dans le développement et le fonctionnement du cerveau étant pour le moment inconnu, l'objectif de cette étude est de caractériser son fonctionnement en utilisant des souris mutantes pour ce gène.

La diminution de la taille du cerveau chez les patients suggère l'implication de la CAPN10 dans la division et/ou la mort cellulaire au cours du développement du cerveau. Nous proposons pour ce projet d'étudier le rôle de la CAPN10 dans la prolifération cellulaire lors du développement du cerveau chez la souris mutante pour le gène CAPN10. Tout d'abord, les souris femelles gestantes seront injectées à différents stades embryonnaires, avec une molécule qui peut s'incorporer dans l'ADN au cours de la réplication cellulaire. Cela permettra donc de marquer les cellules en division chez les embryons. Par la suite, les embryons seront prélevés à des temps différents et des analyses immunohistologiques seront effectuées afin de détecter les cellules en prolifération dans le cerveau des embryons. Pour finir, le comptage du nombre de cellules en division nous permettra d'évaluer l'efficacité de la prolifération cellulaire.

Ces nouvelles connaissances permettront de mettre en évidence la fonction de la CAPN10 dans la formation du cerveau et d'avoir certainement une meilleure compréhension des DI associées à la perte de fonction de ce gène chez l'Homme.

Règle des 3R :

Remplacement : La compréhension des mécanismes physiologiques et moléculaires ainsi que les origines développementales des pathologies génétiques associées à des retards mentaux requièrent l'étude d'un organisme vivant dans son intégrité et sa globalité. A ce jour, il n'existe pas de méthode autre que l'étude *in vivo*. La souris est une espèce physiologiquement et génétiquement proche de l'Homme dans laquelle nous pouvons réaliser les manipulations génétiques pour obtenir ces modèles de pathologies humaines.

Réduction : Afin d'effectuer toutes les expériences notre étude nécessitera 21 souris femelles. Nous réaliserons tout d'abord les tests préliminaires avec 6 femelles gestantes afin de mettre au point les protocoles du co-immunomarquage. Les expériences seront poursuivies avec les protocoles donnant les meilleurs résultats. Nos expériences principales seront construites sur des groupes de 5 échantillons (embryons) par génotype pour avoir un résultat significatif. Nous allons utiliser 15 femelles gestantes pour répondre à nos 3 objectifs.

Raffinement : Un suivi des animaux sera réalisé sur la totalité de l'expérience, notamment durant la période gestationnelle où aura lieu le traitement. Les conditions d'élevage seront améliorées pour les femelles gestantes par l'apport de matériel leur permettant de faire un nid.

10051 Les sarcomes des tissus mous représentent un groupe hétérogène de tumeurs (50 types différents), affectant chaque année 4500 adultes et enfants. Le décès survient dans près de 50% des cas parce que les médecins ne disposent que de chimiothérapies palliatives. La trabectedine (ou Yondelis) a obtenu l'AMM (Autorisation de Mise sur le Marché) en Europe et aux Etats-Unis il y a quelques mois : ce médicament provoque des cassures dans l'ADN, conduisant ainsi à la mort de la cellule. Il y a malheureusement de nombreux patients qui ne répondent pas bien à ce traitement et il reste important d'essayer d'améliorer les traitements existants en leur associant d'autres molécules. Par exemple, des nouvelles molécules appelées Dbaits (DT01) : ce sont de petites molécules d'ADN double brin qui vont fonctionner comme un leurre dans la cellule cancéreuse en mimant des fragments d'ADN endommagés. Ainsi, la machinerie cellulaire de réparation va fortement s'activer, et le système cellulaire identifiant de trop nombreux fragments d'ADN défectueux sera alors débordé. Par conséquent, le Yondelis aura la possibilité d'agir plus efficacement en provoquant des cassures dans l'ADN qui ne pourront pas être réparées, conduisant à la mort de la cellule cancéreuse. Il sera également très intéressant d'associer ces Dbaits avec de la radiothérapie, qui représente l'autre traitement de référence dans les sarcomes des tissus mous.

Nous sommes localisés dans un centre de référence dans le traitement de ce cancer rare et nous avons donc la possibilité d'obtenir des tumeurs de patients et ainsi de pouvoir développer des lignées cellulaires et des modèles de souris greffées avec ces lignées cellulaires. Les tests seront d'abord réalisés sur des cellules en culture et s'ils sont concluants, ils seront réalisés sur des souris dans lesquelles auront été injectées les cellules en sous-cutanées. Nous souhaiterions réaliser ces expérimentations sur 4 lignées qui représentent les 4 principaux types des sarcomes des tissus mous.

Nous appliquons la règle des 3 R :

Ces expérimentations in vivo s'inscrivent dans un projet de recherche qui vise à élargir l'éventail thérapeutique dans le traitement des sarcomes des tissus mous, elles sont obligatoires avant de pouvoir réaliser les essais chez l'homme et pour l'étude des sarcomes il n'y a pas encore de modèle 3D.

Le nombre de souris est limité au maximum, le but étant d'obtenir des données significatives d'efficacité du médicament.

Toutes les expérimentations sont réalisées par du personnel qualifié. Les animaux sont surveillés par le personnel de l'animalerie quotidiennement et sont hébergés dans des cages comprenant une nourriture adaptée enrichie par des tunnels en polycarbonate.

Ce projet nécessitera l'implantation de 384 animaux sur 3 ans.

10052 La maladie de Charcot-Marie-Tooth (CMT) est une maladie héréditaire qui se traduit par une faiblesse et une perte de la masse musculaire et sensorielle au niveau des membres inférieurs et des avant-bras, conduisant à terme à l'incapacité des patients à se mouvoir. Cette maladie est associée à des mutations du gène Mitofusin 2 qui encode pour une protéine MFN2 dont le rôle reste encore méconnu. Il n'y a actuellement aucun traitement efficace pour prévenir ou ralentir le processus de la maladie.

À l'instar de l'homme, la souris présente deux protéines mitofusines : MFN1 et MFN2. Ces deux protéines possèdent des structures et fonctions similaires, mais seule la protéine MFN2 a été associée à des pathologies. Notre projet a pour objectif d'étudier le rôle physiologique des protéines MFN1 et MFN2 afin de mieux appréhender les dysfonctions conduisant à la neuropathie CMT et afin de définir de nouvelles approches thérapeutiques. Cette étude vise dans un premier temps à définir le rôle essentiel des protéines MFN1 et MFN2 dans le développement embryonnaire, puis l'utilisation de modèles murins transgéniques cardiaques nous permettra de définir le rôle de ces deux protéines dans le métabolisme énergétique cellulaire. Ces protéines ne sont apparues au cours de l'évolution qu'au stade mammifère et sont absente dans d'autres organismes modèles plus simples que la souris. Enfin, les souris transgéniques utilisées lors de cette étude ont été générées en 2009 et nos études ont démontrées leur validité comme modèle pour cette pathologie. Ce projet a été approuvé par de nombreux experts scientifiques internationaux indépendants et bénéficie déjà de financements garantissant sa faisabilité financière sur 4 ans. Ce projet va durer 5 années.

Il n'est pas possible de remplacer l'utilisation d'animaux, car le syndrome de Charcot-Marie-Tooth est trop complexe pour être entièrement modélisé in vitro ou in silico, car les acteurs tissulaires, cellulaires et moléculaires sont extrêmement nombreux.

En matière de réduction, une partie de ce projet vise à générer des outils de culture cellulaire in vitro, qui vont permettre de réaliser une partie importante de la caractérisation de cette pathologie et de tester les premières approches thérapeutiques. Ces outils permettront de limiter le nombre d'animaux à utiliser dans cette étude, et pourront être partagés comme outils d'étude à l'échelle internationale. Le nombre de souris requises pour atteindre les objectifs de notre projet de recherche, et ce, validé par des analyses statistiques de type ANOVA (test très généralement utilisé pour ces études) va nécessiter l'utilisation et l'euthanasie de 200 souris par an, soit 1000 souris au total.

L'état de santé et le bien-être de nos animaux, seront suivis quotidiennement pour détecter d'éventuels signes cliniques. De plus, chaque cage reçoit un enrichissement du milieu. La plupart des analyses mises en œuvre dans notre étude seront des analyses post mortem et correspondent à des procédures sans réveil. Ainsi, en matière de raffinement, la souffrance ou la détresse animale sera prise en compte de la naissance jusqu'à leur mort.

10053 Les anticoagulants sont recommandés pour la prévention et le traitement de la maladie thrombo-embolique veineuse (TEV) et la prévention des événements thrombo-emboliques chez les patients souffrant de fibrillation auriculaire (FA) et de syndrome coronaire aiguë (SCA). Les options thérapeutiques disponibles comptent, entre autres, les antagonistes de la vitamine K (AVK), et une catégorie nouvellement apparue d'inhibiteurs directs du FXa (i.e. Rivaroxaban). La combinaison des anticoagulants oraux avec les traitements antiplaquettaires dans la prévention secondaire après SCA apporte un bénéfice, cependant au prix d'une augmentation importante du risque d'événements hémorragiques majeurs.

Ce projet a pour objectif d'évaluer les effets relatifs des anticoagulants oraux en association ou non avec les traitements antiplaquettaires sur les fonctions plaquettaires et la thrombose. Avec comme hypothèse de travail que le traitement par anticoagulants oraux en monothérapie pourrait prévenir le risque thrombotique sans effet délétère sur le risque hémorragique.

Pour se rapprocher de la pathologie humaine, nous utiliserons un modèle de thrombose artérielle chez la souris et nous déterminerons si les différents anticoagulants oraux affectent l'adhésion et l'agrégation plaquettaire et le dépôt de fibrine au niveau du site de lésion vasculaire.

Remplacer : Dans la mesure du possible, les expériences in vivo sur souris seront remplacées par des études in vitro sur cellules.

Réduire : Le nombre d'animaux utilisés lors des expériences sera réduit au minimum nécessaire, avec la contrainte d'obtenir des données statistiquement significatives. Il a été estimé en prenant en compte les paramètres suivants : l'hypothèse est que le traitement est efficace s'il augmente le temps d'occlusion de 50% ; un risque alpha fixé à 5% et un risque beta (puissance) à 80%.

Raffiner : Afin de limiter l'angoisse, l'inconfort, le stress et la douleur associés, les expériences sont raffinées. L'établissement d'expérimentation a mis en place un enrichissement du milieu et les animaux sont hébergés en groupe afin de permettre la socialisation.

Toutes les expériences de thrombose seront réalisées sur des animaux anesthésiés. A la fin de l'expérience d'une durée d'une heure, les animaux anesthésiés seront euthanasiés.

L'ensemble de ces expériences décrites dans ce document nécessitera 144 souris.

10054 Le vieillissement de la population et les maladies cardiovasculaires génèrent des pathologies parmi lesquelles l'insuffisance rénale, qui au stade sévère, occasionne des traitements lourds tels que la dialyse et la transplantation. La dysfonction rénale se traduit généralement par une diminution de la fonction de filtration du rein. Environ 10 % de la population générale, dont deux tiers d'hommes, présenterait une insuffisance rénale. Il est donc essentiel de pouvoir diagnostiquer efficacement cette maladie afin de prendre en charge au plus vite les patients, et ainsi, empêcher sa progression vers un stade sévère tel qu'une insuffisance rénale chronique. Les biomarqueurs utilisés actuellement pour évaluer l'avancée de la maladie sont des mesures indirectes de protéines données (comme la créatinine), dans le sang, mais ces mesures sont insuffisantes car imprécises

et non spécifiques. Il est donc nécessaire de disposer de nouvelles méthodes de diagnostic quantitatives plus fiables de la dysfonction rénale.

Le but de ce projet sur 1 an est d'évaluer de nouvelles molécules d'imagerie, appelées sondes, pour le diagnostic de la dysfonction rénale sur un modèle murin. Un modèle de fibrose rénale chez la souris reflétant cette pathologie, permettra d'évaluer la capacité de nos sondes à diagnostiquer la pathologie. Les résultats obtenus seront comparés à ceux observés chez des souris saines pour évaluer l'accumulation de la sonde d'imagerie dans la pathologie. Les modèles de fibrose ou dysfonction rénale ne possèdent pas d'équivalent en modèle in vitro. L'utilisation du modèle animal reste indispensable pour atteindre l'objectif du projet.

Les animaux sains et ceux présentant l'insuffisance rénale seront anesthésiés par isoflurane pour l'injection de l'agent radiomarqué via la voie sinus retro orbitaire et seront maintenus sous anesthésie gazeuse au cours de l'imagerie pour limiter leur stress et leur mouvement. Au cours du projet, les animaux passeront sous caméra à plusieurs reprises afin de déterminer la biodistribution de l'agent d'imagerie ainsi que le protocole optimal d'acquisition des images. L'utilisation de l'imagerie permet ainsi le suivi du même animal au cours du temps et ainsi une réduction du nombre d'animaux nécessaires pour atteindre l'objectif. Le nombre d'animaux a été limité au minimum pour obtenir des résultats avec des tests biostatistiques utilisés (test statistique de Kruskal-Wallis avec un paramètre alpha égale à 5%). En fin de procédure les animaux seront euthanasiés et des organes d'intérêts tels que les reins seront prélevés afin de corroborer les résultats obtenus par imagerie avec les méthodes d'analyses de référence telles que l'autoradiographie, l'histologie et le comptage tissulaire.

Des antidouleurs seront utilisés en cas de nécessité. Des points-limites ont été établis et une grille d'évaluation de la douleur a été développée spécifiquement pour cette étude. Un score de douleur trop élevé impliquera l'euthanasie de l'animal avant la fin de l'étude.

A terme, les résultats de ce projet permettront de développer une méthode de diagnostic basée sur l'imagerie ainsi qu'un traitement personnalisé contre les dysfonctions rénales, avec une perspective de transfert chez l'Homme.

Cette demande ne concernant qu'une partie du projet générale nécessitera 24 souris pour la mise au point de la méthode d'imagerie isotopique.

10055 Afin de préserver le bien-être des animaux, les personnes amenées à réaliser des gestes sur des animaux vivants doivent être formées et entraînées. Ainsi le geste bien maîtrisé ne provoquera qu'une gêne minimale à l'animal. Au sein de notre établissement, un programme de formation des nouveaux entrants et des personnels qui ressentent le besoin de se remettre à jour est établi. Le but de ce projet est de former aux méthodes de prélèvements utilisées dans l'établissement des personnes habilitées à l'expérimentation animale. Les techniques de prélèvement enseignées seront : prélèvement à l'aorte abdominale, prélèvement à la queue, prélèvement sub-mandibulaire, prélèvement rétro orbital, prélèvement à la veine jugulaire. Cette formation pratique est dispensée par une personne experte qui s'assurera à l'issue de la formation de la maîtrise du geste. Un suivi de ces formations pratiques est mis en place afin de garantir que toutes les personnes devant intervenir sur les animaux maîtrisent les techniques. Tout au long de cette formation, une attention particulière est apportée au respect des 3 R : Remplacer ; Réduire ; Raffiner.

Remplacer : Il n'est pas possible de remplacer l'utilisation de l'animal pour cet apprentissage car la manipulation des êtres vivants demande de la maîtrise qui ne peut s'acquérir qu'en pratiquant avec l'animal vivant.

Réduire : Ce projet vise à former les expérimentateurs aux gestes de base pratiqués au sein de notre unité de recherche. Avant la formation, les besoins sont analysés et la personne ne sera formée que pour les gestes qui lui seront nécessaires. Pour limiter le nombre d'animaux nécessaire, le geste est d'abord expliqué à l'aide d'un schéma. Pour la partie pratique nous n'utiliserons que des animaux de réforme nés dans notre animalerie qui ne peuvent pas être utilisés dans d'autres projets et destinés à être euthanasiés, par exemple parce qu'ils sont nés avec un génotype non souhaité.

Ce nombre peut être réduit si la maîtrise du geste est acquise avant d'avoir utilisé tous les animaux prévus. Si plusieurs gestes doivent être acquis, l'apprentissage peut se faire sur le même animal

dans la mesure où le temps d'intervention et les conditions d'anesthésie et d'antalgie sont maintenus.

Raffiner : Avant d'expérimenter sur des animaux vivants, le geste est expliqué par le formateur, puis l'apprenant observe des personnes expertes dans la réalisation de ces gestes. Ensuite tous les gestes seront réalisés avec des animaux anesthésiés. Le nombre d'essais sur les animaux est limité de 1 à 4 selon les techniques et les animaux seront euthanasiés à la fin de la procédure afin d'éviter tout mal-être dû à la maladresse des apprenants.

L'euthanasie des animaux sera réalisée par le formateur.

Une estimation de 3250 souris sur 5 ans est établie pour permettre à 50 personnes la maîtrise de 5 gestes différents. C'est un nombre maximal qui ne concerne que des souris de réforme. Ce nombre sera diminué si l'apprenant a besoin de moins d'individus pour maîtriser le geste. Si plusieurs méthodes doivent être enseignées, l'apprentissage se fera sur le même individu ce qui réduira d'autant le nombre nécessaire.

10056 La polyarthrite rhumatoïde (PR) est la cause la plus fréquente des polyarthrites chroniques. C'est une maladie dégénérative inflammatoire chronique, caractérisée par une atteinte articulaire souvent bilatérale et symétrique, évoluant par poussées vers la déformation et la destruction des articulations atteintes. La polyarthrite rhumatoïde est une maladie auto-immune reconnue pour présenter un nombre anormal de lymphocytes T dans les articulations qui produisent des cytokines inflammatoires, notamment le TNF, activant des macrophages. Ces macrophages vont à leur tour stimuler les chondrocytes, les fibroblastes et les ostéoblastes qui vont respectivement dégrader le cartilage, la matrice articulaire et déminéraliser les os composant l'articulation.

Plusieurs approches ont été développées chez la souris pour induire l'arthrite soit par immunisation ou par injection. Le modèle d'arthrite induite au collagène (CIA) est le plus connu car il implique l'immunisation avec une composante du cartilage : le collagène. Ce modèle a permis de démontrer que l'auto-immunité au collagène permet de développer une arthrite auto-immune caractérisée par une inflammation de la membrane synoviale, une destruction du cartilage articulaire et une érosion osseuse, analogues à la PR humaine.

Dans notre laboratoire, nous avons pu montrer que la stimulation électrique des nerfs spléniques ou du nerf vague chez la souris inhibe la production de TNF consécutive à l'injection d'une substance inflammatoire mais également le développement de l'arthrite rhumatoïde.

L'objectif de ce projet est de comparer l'efficacité du traitement contre la PR par un anticorps anti-TNF utilisé en clinique (Etanercept) à celui par électrostimulation du nerf splénique dans un modèle murin. Le projet consiste donc à :

- induire une polyarthrite rhumatoïde expérimentale ;
- implanter ou non une électrode de stimulation au niveau des nerfs apical ou artériolaire de la rate chez la souris ;
- puis soit injecter un anticorps anti-TNF (Etanercept) chez les souris non implantées soit réaliser des sessions d'électrostimulation chez les souris implantées.

La comparaison des scores cliniques entre les animaux ayant reçu l'anticorps et ceux ayant subi une électrostimulation des nerfs nous permettra de déterminer l'efficacité thérapeutique relative de l'électrostimulation par rapport à l'administration d'Etanercept sur le développement de la PR.

L'utilisation de l'animal est indispensable à la conduite de cette étude car elle nécessite la préservation de l'intégrité du système nerveux et immunitaire. Le nombre total de souris utilisées pour ce projet est de 72. Des tests statistiques seront réalisés à la fin de chaque expérimentation pour réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. Par ailleurs des raffinements sont proposés notamment pour limiter la souffrance animale en mettant en place des protocoles adaptés d'anesthésie et d'analgésie complétés par un suivi postopératoire comprenant la mise en place des points limites précoces et adaptés (cf annexe 1 et 2).

10057 L'obésité est un problème de santé mondial associé à des comorbidités chroniques et sévères comme le diabète. Au-delà des approches pharmacologiques et diététiques, la stratégie la plus efficace pour la combattre implique une intervention chirurgicale. Les patients qui subissent une chirurgie bariatrique perdent rapidement du poids et, de manière encore plus remarquable,

présentent une rémission rapide de leur diabète. Malgré son efficacité, la chirurgie bariatrique n'est pas une option pour tous et reste une intervention très coûteuse avec de lourds effets secondaires. Ainsi, la compréhension des mécanismes biologiques responsables de la perte de poids et des améliorations métaboliques induites par ce type de chirurgie est cruciale pour que l'on puisse les cibler de manière moins invasive.

Les sujets obèses qui suivent une chirurgie bariatrique ont une augmentation des sels biliaires dans la circulation, ce qui est lié aux effets bénéfiques de la chirurgie. Ceci suggère que l'activation du récepteur des sels biliaires TGR5 (Takeda G protein-coupled receptor 5) pourrait être une cible thérapeutique, et mieux encore, une alternative à une intervention chirurgicale. Comme les réponses métaboliques périphériques sont coordonnées au niveau central principalement par l'hypothalamus, nous avons émis l'hypothèse de l'existence d'un système de signalisation des sels biliaires dans cette structure.

Notre objectif est donc de comprendre les effets hypothalamiques de la signalisation de sels biliaires dans la régulation de la balance énergétique, notamment dans le contexte de l'obésité et des troubles métaboliques associés.

Pour ce faire, nous utiliserons des approches pharmacologiques pour activer le récepteur TGR5, et génétiques pour induire l'élimination du récepteur TGR5 dans l'hypothalamus et dans certains types de populations neuronales connues avoir un rôle dans le contrôle de la balance énergétique. Dans nos études, nous évaluerons le poids corporel, la prise alimentaire, la composition corporelle, la dépense énergétique et la glycémie.

Nous prévoyons d'utiliser un maximum de 864 souris mâles adultes, car ce projet sera réalisé pendant 5 ans. Nous avons optimisé les protocoles afin de réduire au maximum le nombre de souris utilisées : des tests de puissance statistique ont été employés pour calculer le plus petit nombre d'animaux par groupe nécessaire à l'obtention de résultats statistiquement exploitables. En plus, ce chiffre comprend le nombre d'animaux utilisés pour des études préliminaires (pilotes), afin de déterminer les doses optimales des composés qui seront testés dans nos expériences et mettre en place de nouvelles techniques, ce qui permettra de diminuer la quantité d'animaux utilisés à long terme. La souris représente un modèle de choix pour notre projet par la possibilité d'étudier des individus génétiquement modifiés et dont la physiologie générale est suffisamment proche de celle de l'être humain pour que les informations obtenues soient pertinentes sur un plan médical. De plus, les mécanismes biologiques que nous étudions impliquent une communication bidirectionnelle entre le cerveau et le reste de l'organisme, que ce soit pour la régulation de l'appétit, de la glycémie (taux de sucre dans le sang) ou encore le stockage de graisse. Ainsi, il est absolument nécessaire d'étudier un organisme entier et aucune méthode in vitro ou in silico ne peut le remplacer. Nous mettons en place des techniques de soulagement de la douleur après la chirurgie, ce qui permet de raffiner cette procédure amplement utilisée dans notre laboratoire. Enfin, le suivi précis du poids et de la prise alimentaire de chaque souris nécessite un isolement de l'animal. Ainsi, les souris sont hébergées en cages individuelles dans une pièce dédiée, avec régulation de la température, de l'humidité et de la luminosité. Le manque d'interactions sociales est compensé par un enrichissement des cages. En outre, les cages, transparentes, sont rapprochées les unes des autres afin que chaque animal puisse avoir un contact visuel avec ses congénères afin de garantir la bonne prise en charge de nos animaux.

L'ensemble des procédures proposées est en conformité avec les directives européennes 2010/63/UE et françaises, dans le respect des nouveaux standards de soin appliqués dans notre équipe de recherche : régulation de la température, de l'hygrométrie (taux d'humidité dans l'air), raffinement de l'enrichissement des cages pour améliorer leur hébergement. Les recherches seront réalisées en accord avec les recommandations institutionnelles pour le bon traitement des animaux de laboratoire. Tous les efforts seront faits pour réduire le nombre et la souffrance des animaux utilisés afin d'éviter les répétitions inutiles.

10058 La reproduction chez les caprins est saisonnée. Elle a lieu naturellement à l'automne et en hiver (saison sexuelle). Cette saisonnalité conduit à des variations annuelles dans la disponibilité des produits et du prix du lait sur le marché. La mise à la reproduction hors saison sexuelle

(contresaison) est une solution pour maintenir l'offre en lait ou fromage tout au long de l'année (enjeu majeur pour la filière caprine).

Différentes techniques (traitements hormonaux, effet mâle, traitements lumineux et mélatonine) sont disponibles pour maîtriser la saisonnalité de la reproduction. Les traitements hormonaux d'induction des chaleurs (comportement d'acceptation de la monte du mâle) et des ovulations sont la pratique la plus efficace pour dessaisonner la reproduction. Or, le contexte réglementaire et sociétal actuel oriente vers une moindre utilisation des hormones en élevage, dans l'objectif de réduire leurs résidus dans les produits animaux et le risque de contamination de l'environnement via les effluents.

Des méthodes alternatives aux hormones existent, notamment « l'effet mâle ». L'effet mâle consiste à stimuler l'activité ovulatoire de chèvres au repos sexuel par leur exposition à de mâles sexuellement actifs. Toutefois, le développement de cette pratique en élevage est freiné par la forte variabilité des résultats techniques obtenus.

L'efficacité de l'effet mâle peut être améliorée lorsque les boucs et les chèvres sont soumis parallèlement à des traitements lumineux. Cependant, il est souvent nécessaire de les associer à une hormone (la mélatonine). Aucune méthode alternative à l'utilisation de mélatonine n'est disponible.

L'objectif du projet est d'améliorer l'efficacité de l'effet mâle, grâce au développement d'un nouveau traitement lumineux excluant l'utilisation de mélatonine. Deux expériences seront réalisées sur 2 années consécutives afin de i) déterminer à quel moment du traitement les chèvres ovulent spontanément et les boucs sont sexuellement actifs, pour définir quand l'effet mâle peut être réalisé, et ii) évaluer la réponse comportementale et ovulatoire des chèvres à l'effet mâle en utilisant le nouveau traitement lumineux. Dans les 2 expériences, les résultats seront comparés entre les animaux recevant le nouveau traitement (sans mélatonine) et ceux recevant la photopériode naturelle (témoin négatif) ou le traitement de dessaisonnement de référence (témoin positif, recevant de la mélatonine). Un total de 30 chèvres adultes taries (10 par groupe) et 15 boucs pubères (5 par groupe), de race alpine, seront utilisés.

Ces expérimentations comprennent 2 procédures impliquant des traitements lumineux et des prélèvements sanguins dans la veine jugulaire (au niveau du cou).

Remplacement :

L'activité sexuelle du bouc, l'ovulation et l'expression des chaleurs sont de phénomènes complexes qui ne peuvent pas être étudiés in vitro.

Réduction :

Un calcul de puissance statistique a été fait pour réduire au minimum le nombre d'animaux. Les mêmes animaux seront utilisés l'année 1 et 2.

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 antiseptique et cicatrisant). Les traitements lumineux respectent le rythme jour-nuit des animaux avec des durées d'éclairage journalier observés sous nos latitudes.

10059 Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est le premier cancer primitif du foie en incidence. Il est la 2ème cause de mortalité par cancer dans le monde, et représente 8500 nouveaux cas par an en France. Son traitement repose sur le dépistage des sujets à risque et sur son traitement à un stade précoce afin d'obtenir la guérison. Il survient dans 90% des cas sur un fond de maladie du foie au stade de cirrhose.

Le Sorafenib, le seul traitement approuvé pour le CHC à un stade avancé, entraîne souvent des effets secondaires graves qui altèrent la qualité de la vie du patient. Par conséquent, il existe un besoin urgent de thérapies nouvelles, efficaces et sûres. Ainsi, les modèles animaux de CHC sur le fond de la fibrose/cirrhose récapitulant au plus près la maladie humaine, doivent être développés afin de tester la tolérance et l'efficacité de nouveaux traitements.

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

Remplacement : La carcinogenèse hépatique est un processus impliquant différents types cellulaires au sein du foie. Les lignées hépatocytaires tumorales humaines ne permettent pas de

reproduire tout ce processus. L'utilisation de modèles animaux n'est donc pas pour l'instant remplaçable dans ce type d'études.

Réduction : Un calcul des effectifs nécessaires basé sur une variable biologique simple (incidence de CHC) nous permettra d'atteindre une significativité des résultats avec un minimum d'animaux. De plus, ces analyses permettront de nous préparer pour des études précliniques ultérieures avec le meilleur modèle et ainsi de réduire le nombre d'animaux utilisés dans les phases précliniques ultérieures.

Au total, 160 animaux seront nécessaires pour ce projet.

Raffinement : À ce jour, la plupart des modèles animaux de CHC, sont des modèles de souris. Or la souris n'est pas capable de développer une cirrhose décompensée. Ce n'est donc pas un modèle animal qui reproduit la pathologie humaine. Cette approche représente un raffinement essentiel des modèles in vivo de carcinogenèse hépatique. Pour pallier ce problème, nous avons pu montrer que les rats traités par injection intra-péritonéale d'un agent chimique fibrosant, le diéthylnitrosamine (DEN), récapitulait très bien la maladie humaine avec cirrhose et cancer. Ce modèle a été utilisé pour tester les nouvelles thérapies de CHC. Cependant, malgré de nombreux points positifs, ce modèle chimiquement induit ne permet pas les modifications contrôlées de voies spécifiques de carcinogenèse. Afin de d'améliorer ce modèle in vivo, nous proposons d'utiliser une nouvelle approche d'induction de la fibrose par l'administration du tétrachlorure de carbone (CCl₄). En revanche, le traitement par CCl₄ n'induit que peu de CHC. Nous allons donc dans ce nouveau modèle de rat fibrotique/cirrhotique induire l'apparition de CHC en combinant l'administration de CCl₄ avec une extinction spécifique de gènes, en utilisant le système d'édition génomique CRISPR/Cas9 apporté par des vecteurs adénoviraux. Dans ce projet nous ciblerons la voie de signalisation cellulaire Wnt/ β -Catenin, très fréquemment altérée dans les CHC humains. Ici, le raffinement des 3R s'étend donc au-delà de ce projet avec un impact fort sur la méthodologie à venir et la transposition des résultats à l'homme. De plus, toutes injections et prélèvements sur animaux vivants seront réalisés sous anesthésie pour juguler douleurs et angoisses associées, avec réveil sur tapis chauffant. La sociabilité des rats sera préservée au maximum en évitant l'isolement.

10060 Le projet vise à étudier les propriétés mécaniques du tissu hépatique dans la progression de la fibrose. En effet, la fibrose est une maladie du foie très répandue. Si elle n'est pas détectée et contrôlée, la fibrose peut dégénérer vers des maladies plus graves telles que la cirrhose ou même le cancer.

Les techniques actuelles permettant de diagnostiquer la fibrose sont encore peu précises et souvent invasives comme par exemple la biopsie. Pourtant, la fibrose et l'inflammation se manifestent entre autres par des changements des propriétés mécaniques du tissu ainsi que par une différence de l'avidité du foie pour certains agents de contraste. Or ces propriétés (l'élasticité du tissu, son caractère plus ou moins "souple", "dur", et sa capacité à retenir les agents de contraste) peuvent être mesurés très précisément par des techniques d'imagerie particulières basées sur l'IRM : l'élastographie (pour les propriétés mécaniques) et l'IRM de contraste (pour la capacité de retenir les agents de contraste). Ces techniques présentent de nombreux avantages, dont leur précision et le fait qu'elles ne sont pas invasives. Cependant, des études supplémentaires sont requises pour améliorer encore la précision et la fiabilité de ces techniques innovantes, en particulier pour les stades les plus précoces de la maladie.

Pour ce faire, des études seront réalisées sur des modèles animaux de fibrose. La fibrose sera obtenue au moyen de stresseurs chimiques (tétrachlorure de carbone) ou métaboliques (diètes spécifiques), et ce sur des souris non transgéniques. Les techniques d'imagerie (élastographie et IRM de contraste) seront réalisées sur les animaux anesthésiés, puis dans certains cas sur des fragments de foie en coupes fines obtenues après euthanasie. Un total de 135 souris est prévu pour cette étude. Ce chiffre a été obtenu via l'application de la règle du remplacement, de réduction et de raffinement, dite "règle des 3R".

Remplacement : Il n'y a pas de méthode substitutive possible connue à ce jour.

Réduction : Ce nombre est issu d'une analyse de puissance ayant pris en compte la variabilité de la méthode de mesure et le degré de confiance souhaité dans les tests statistiques. Ce nombre

permet la réalisation d'expériences sur un nombre suffisant d'animaux témoins pour assurer la validité des résultats, et donc de ne pas nécessiter d'avoir recours à plus d'animaux ultérieurement. Raffinement : Ce chiffre tient compte d'une conception expérimentale optimisée avec de nombreuses mesures visant à maximiser la quantité d'information pertinente qui sera obtenue pour chaque sujet. Naturellement, les expériences in vivo seront réalisées de manière totalement non invasive et sans douleur pour l'animal, s'agissant d'une technique d'imagerie in vivo. Pendant les procédures, les animaux seront anesthésiés et leur température corporelle régulée par un système adéquat. Leur rythme respiratoire et leur température corporelle seront contrôlés en temps réel tout au long des expériences.

10061 A l'heure actuelle, l'alimentation des poulets de chair repose fortement sur l'utilisation de matières premières importées telles que le soja. Sur le plan environnemental comme sur le plan économique, il faudrait donc renforcer la part de matières premières locales dans la production des poulets européens. Cependant, dans cette production très compétitive, il est primordial que les performances des animaux soient maintenues pour pouvoir être utilisées en pratique. La capacité des animaux à digérer leur aliment est un bon indicateur de leur capacité à utiliser ces nouvelles matières premières tout en maintenant un bon niveau de performances. De précédentes études ont montré qu'on pouvait améliorer ce critère par la sélection génétique sur des animaux à croissance modérée. Il faut désormais acquérir des connaissances sur les poulets à croissance rapide, qui constituent l'essentiel du marché du poulet.

Nous proposons donc de tester chez le poulet de chair à croissance rapide la possibilité d'améliorer par la sélection la capacité à digérer des aliments alternatifs. Comme ces poulets sont issus du croisement de deux génotypes (un pour la mère, un pour le père), nous testerons ce paramètre dans ces deux génotypes. Trois régimes seront testés : un régime classique reposant sur l'utilisation du soja, un régime alternatif remplaçant 65% du soja par des ressources locales (tournesol, colza, lupin) et un régime alternatif remplaçant la totalité du soja par des ressources locales.

Au total, 158 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 animaux seront observés tous les jours, et si un animal se développe mal ou s'il est en souffrance, il sera aussitôt euthanasié par la méthode adéquate.

10062 Une meilleure compréhension des fonctions cognitives est un défi majeur en neurosciences. Ce projet vise à mieux comprendre l'excitabilité cellulaire et la connectivité synaptique dans l'hippocampe, dans les structures parahippocampiques et sous-corticales, régions qui jouent un rôle important dans l'orientation spatiale et la mémoire. Ce circuit est une des premières régions du cerveau affecté dans la maladie d'Alzheimer, et de l'épilepsie du lobe temporal. Notre recherche vise à élucider les éléments cellulaires et leur connectivité anatomique et fonctionnelle, afin de mieux comprendre comment les informations vestibulaires et visuelles sont intégrées pour permettre l'orientation spatiale de l'individu.

Ce projet sera réalisé chez la souris et le rat. Un total de 820 animaux, 760 souris et 60 rats, sera nécessaire à la réalisation du projet. Le choix de la souris est justifié par la possibilité de faire appel à des outils moléculaires sophistiqués qui vont permettre de corréler les études in vivo et in vitro, et de cibler particulièrement certains types neuronaux.

Le choix du rat est justifié par le fait que la plupart des références bibliographiques disponibles viennent d'études menées chez le rat qui est utilisé pour sa plus grande taille et sa plus grande complexité comportementale. Les animaux seront utilisés au cours de 3 procédures consistant en une chirurgie, des injections stéréotaxiques, des mesures comportementales et des mesures de l'activité électrique des neurones.

Le protocole respecte la règle des 3R : Remplacement : bien que nous ayons besoin des animaux pour obtenir les données brutes, ces données sont ensuite utilisées pour des travaux de modélisation sur ordinateur, reproduisant les résultats observés. Réduction : afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, les études in vivo seront effectuées en chronique, c'est-à-dire qu'une fois implantés les animaux sont gardés en vie et testés à nouveau. Pour les études in vitro, des évaluations statistiques des résultats seront effectuées périodiquement afin de n'utiliser que le nombre d'animaux statistiquement nécessaire. Raffinement : 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 dans un environnement enrichi (copeaux, matériel de nidification, bâtonnets à ronger). Enfin, l'eau et la nourriture sont mises à disposition ad libitum.

Notre recherche vise à comprendre les bases anatomiques et fonctionnelles qui permettent au cerveau de s'orienter dans l'environnement. La neurophysiologie des régions hippocampique et parahippocampique est mal connue, pourtant on sait que dans certaines maladies neurologiques, comme l'épilepsie ou la maladie d'Alzheimer ces régions sont atteintes de façon précoce. Une meilleure compréhension du fonctionnement des neurones de ces régions est nécessaire pour permettre un diagnostic précoce et un traitement de ces pathologies neurologiques.

10063 La rectocolite hémorragique (RCH), pathologie du groupe des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) se caractérise par une inflammation chronique du rectum et du côlon épargnant l'intestin grêle. Les patients atteints de RCH présentent une majoration significative du risque de développer un cancer colorectal par rapport à la population générale au cours de leur vie. Ce cancer est alors souvent développé plus jeune que le cancer sporadique, en moyenne à 50 ans avec plus fréquemment plusieurs cancers du côlon découverts au même moment et dont le pronostic est souvent moins bon. Le mécanisme physiopathologique de la tumorigenèse chez ces patients n'est pas parfaitement connu mais l'inflammation chronique du colon et du rectum a été mise en cause. Dans la littérature, il a été démontré que l'appendicectomie chez les patients atteints de RCH augmente le risque de cancer colorectal d'un facteur 17. Or, l'appendicectomie était connue pour diminuer l'activité de la RCH, ce qui remet en cause l'idée que seule l'inflammation chronique dans la RCH est responsable du développement de tumeurs. Sur un modèle expérimental de souris reproduisant la RCH, l'appendicectomie en dehors d'une appendicite aiguë était associée à une augmentation significative du développement du cancer colorectal sans majoration de l'inflammation colique. Ce lien entre appendicectomie et la majoration du risque de cancer colorectal, notamment chez les patients atteints de RCH, n'est pas connue. L'appendice fait partie des tissus lymphoïdes associés au tube digestif et les mécanismes immunologiques responsables d'une diminution de l'activité de la colite lors d'une appendicite aiguë suivie d'une appendicectomie ont été partiellement mis en évidence avec notamment le rôle protecteur d'une sous-population de lymphocytes appelé lymphocytes T régulateur sur la colite. Le rôle des cellules immunitaires présentes dans l'appendice et impliquées dans le contrôle du développement tumoral est inconnu à ce jour.

Cette question de l'immunité anti-cancer est d'actualité devant l'essor récent de l'immunothérapie en oncologie avec des résultats spectaculaires dans certains cancers comme le mélanome métastatique ou encore certaines formes de cancer du poumon.

Dans le cancer du côlon sporadique, l'immunothérapie développée à ce jour n'est efficace que chez seulement 10% des patients présentant le sous-type particulier de tumeurs du colon avec instabilité des microsatellites. L'immunothérapie n'a jamais été évaluée dans le cancer du côlon dans un contexte de colite chronique comme chez les patients atteints de RCH.

Au total, notre objectif principal est donc de préciser l'immunité anti-tumorale dans le cancer du côlon en situation de colite chronique. Nous souhaitons aborder cette problématique selon deux axes. Premièrement, en cherchant à mieux déterminer sur le plan immunologique l'implication de l'appendice dans la protection contre le cancer. Pour cela, nous voudrions utiliser chez la souris un modèle de cancer colorectal sur colite chronique induite chimiquement afin de valider l'effet pro-

tumoral de l'appendicectomie sans appendicite. De plus nous étudierons les différentes populations immunitaires mise en jeu dans cette immunité anti-cancer médiée par l'appendice. Dans un second temps, toujours sur ce modèle de cancer du côlon sur colite chronique chimiquement induite chez la souris, nous souhaitons évaluer l'efficacité de l'immunothérapie afin de préciser son efficacité éventuelle dans cette situation immunitaire très spécifique. Les souris seront euthanasiées à un stade asymptomatique du cancer avant que le phénotype ne devienne dommageable. Cela permettra de mieux comprendre l'implication des lymphocytes dans l'immunité anti-tumorale du cancer du côlon secondaire à une colite chronique et de préciser si l'inflammation chronique du colon permettrait d'éduquer et de stimuler une immunité anti-tumorale spécifique.

La règle des 3R a été prise en compte dans l'expérimentation proposée :

- Remplacer : La tumorigénèse induite par l'inflammation colique chronique est multifactorielle et médiée par différents mécanismes complexes comme la dysimmunité et l'infection (microbiote). Aucun modèle cellulaire ne permet de reproduire cette complexité et seul le modèle animal permet de conduire ce projet de recherche. La souris est le plus petit animal adapté à ce travail sur l'inflammation colique avec une littérature valide justifiant ce choix.

- Réduire : Les effectifs de chaque groupe ont été réduits à 10 souris soit un total de 60 souris pour l'ensemble de l'expérience. Un effectif plus faible ne permettrait pas de montrer une différence statistique en raison de bruit de fond provoqué par la variabilité interindividuelle. Les tests statistiques seront adaptés à ce faible nombre de souris avec la réalisation de tests non paramétriques ne nécessitant pas une répartition normale des données.

- Raffinement : Les souris seront opérées sous anesthésie générale multimodale afin d'éviter toute souffrance ou douleur de l'animal. Cette anesthésie consistera en l'inhalation d'isoflurane durant toute l'intervention chirurgicale. Les souris seront surveillées quotidiennement et les mesures nécessaires à la prise en charge de la douleur seront adaptées en fonction de l'état des animaux. Les effets du dextran sodium sulfate (DSS) seront aussi contrôlés au cours de son administration, les souris seront pesées tous les jours et surveillées selon un score standardisé de colite clinique. Le protocole de DSS pourra donc être atténué voire suspendu précocement en cas de mauvaise tolérance ou de souffrance avérée des animaux. Une perte de poids > 20 % du poids de départ sur une période de 7 jours, et/ou des signes comportementaux d'inconfort ou de souffrance non soulagée par les antalgiques aboutiront à une euthanasie précoce pour limiter la souffrance de l'animal (point limite). L'environnement des animaux sera enrichi afin de leur permettre d'avoir un comportement le plus naturel possible (cotons, maison, etc.)

10064 La consommation de fer héminique (fer des produits carnés) va provoquer la formation de composés toxiques appelés aldéhydes et modifie la composition du microbiote intestinale, ce qui est proposé pour expliquer l'effet de la consommation de viandes rouges sur le risque cancer du côlon. Des travaux précédents ont permis de proposer qu'un complément en calcium pouvait limiter cet effet et que les bactéries présentes dans les produits laitiers à pâte pressée cuite (propionobactéries) pouvaient provoquer la mort des cellules coliques cancéreuses. Dans ce cadre, ce projet propose de vérifier si les produits laitiers à pâte cuite (riche en calcium et propionobactéries) peuvent protéger contre la formation des aldéhydes, leur toxicité sur la muqueuse colique et la modification de la composition du microbiote intestinale induite par le fer héminique. Pour cela, l'effet du calcium (molécule purifiée ou incorporé dans une matrice laitière) en association ou non avec les propionobactéries (par gavage ou intégrés dans la matrice fromagère) sera évalué sur les effets de l'hème chez le rat : 96 rats Fisher 344 seront intégrés dans le protocole pour suivre la formation et l'activité toxique des aldéhydes dans les fèces, les conséquences sur la muqueuse colique (perméabilité intestinale, toxicité et inflammation), sur la composition du microbiote. Cette expérimentation sans prélèvement sur les animaux hors fèces et urines sera conduite dans le cadre de la règle des trois R : L'utilisation de modèle animal est indispensable car nous travaillons au niveau du côlon où le microbiote joue un rôle très important. Le nombre des animaux est réduit au maximum pour toutefois maintenir une puissance statistique suffisante, les conditions expérimentales (point limites et critères d'interruption définis avec le suivi du poids et du comportement mais aussi utilisation de sondes de gavages à bout arrondi et maintien du contact visuel et olfactif même lors des courts passages en cage individuel) éviteront la douleur

et le stress animale. Les rats seront hébergés dans des locaux d'animalerie conventionnels, leur assurant les meilleures conditions de vie et de bien-être. A la fin de l'étude, les animaux sont euthanasiés de façon à récupérer les muqueuses coliques.

10065 Le mélanome fait partie des cancers les plus métastatiques. Les métastases, communément appelées tumeurs secondaires sont capables d'envahir l'organisme par leur capacité à s'adapter à un nouvel organe et environnement, distant de la tumeur primaire d'origine. Les métastases de mélanome sont responsables de la majorité des échecs thérapeutiques et de la mort des patients. Le but de ce projet est donc d'étudier et de comprendre les mécanismes cellulaires des métastases de mélanome, leurs permettant de s'adapter au nouvel environnement et d'envahir un organe vital, tels que le foie ou le poumon, majoritairement ciblés dans le cas des mélanomes métastatiques humains.

Le mélanome se développe à partir des cellules responsables de la production des pigments mélaniques et par conséquent de la couleur de la peau, appelées mélanocytes. Le facteur de transcription MITF (Microphthalmia-associated Transcription Factor) est défini comme le régulateur clé du développement et de la différenciation de ces mélanocytes, mais est aussi fortement impliqué dans le développement du mélanome. En effet, pour proliférer, les cellules de mélanomes nécessitent une stimulation de l'expression de MITF. Son expression est régulée par l'activation de l'adénylate cyclase, elle-même activée par les récepteurs membranaires RCPGas (récepteur couplé aux protéines Gas) grâce à leur ligand spécifique. Trente-quatre de ces récepteurs sont exprimés à la surface des mélanomes et sont fonctionnels.

Pour développer une tumeur secondaire de mélanome et envahir un nouvel organe, il est fort probable que les cellules métastatiques utilisent des ligands de RCPGas différents de ceux trouvés dans la peau, stimulant ainsi l'expression de MITF.

L'utilisation d'animaux vivants pour ce projet est indispensable car seul un animal vivant, entier, peut permettre d'étudier dans leur globalité le développement des métastases du mélanome ainsi que la réponse anti-tumorale. Il est également indispensable de maintenir l'hétérogénéité du micro-environnement tumoral de la souris mimant fidèlement celui retrouvé chez l'homme et qui met en jeu une série d'interactions non reproductibles in vitro, in silico ou ex vivo. Nous avons conclu qu'aucune méthode alternative ne pourra répondre aux réponses physiopathologiques attendues. Enfin, notre projet offre une opportunité thérapeutique qui justifie la nécessité du modèle animal pour valider les expériences in vivo avant leur application chez l'homme.

Nous avons choisi d'utiliser la souris comme modèle in vivo, car il récapitule fidèlement le microenvironnement tumoral ainsi que les processus métastatiques développés chez l'homme et est donc indispensable pour cette étude. Nous grefferons des cellules tumorales de mélanome dans le derme de l'oreille des souris. 1440 souris seront nécessaires à la mise en œuvre de ce projet. Ce nombre important se justifie par la nécessité d'évaluer l'implication de chaque RCPGas dans le développement des tumeurs secondaires. La réduction a été prise en compte lors des calculs statistiques de puissance. Chaque RCPGas identifiés seront validés afin d'étudier par la suite les réponses anti-tumorales.

Toutes les procédures expérimentales seront réalisées en prenant en considération le bien-être de l'animal, en minimisant l'inconfort et la souffrance par l'administration d'antidouleurs au moindre changement comportemental, et en utilisant des anesthésiques pour toutes les procédures.

10066 L'environnement climatique est un facteur de variation important des performances des porcs dans les différents bassins de production mondiaux. La forte sensibilité des porcs à la chaleur est en partie liée à leur faible capacité à dissiper leur chaleur métabolique mais également à la sélection génétique basée exclusivement sur des caractères de production et généralement réalisée dans des conditions environnementales assez éloignées de celles rencontrées dans les élevages commerciaux. Par ailleurs, il est maintenant acquis que le réchauffement climatique va augmenter les impacts de la chaleur sur l'élevage de porcs. En élevage, les femelles gestantes peuvent être exposées à des perturbations climatiques conduisant à un stress pouvant altérer la maturation fœtale et par la suite affecter le bien-être et les performances ultérieures des porcelets. Des observations de terrains (Australie) et des travaux préliminaires menés aux Etats-Unis suggèrent

qu'un stress thermique chronique pendant la gestation de truies primipares aurait des conséquences sur le métabolisme énergétique des descendants qui se traduiraient par une augmentation de l'adiposité des carcasses et de la température interne des descendants. L'objectif de ce travail exploratoire est d'étudier les conséquences d'un stress thermique anténatal sur les performances des porcs pendant toute leur vie productive (de la naissance à l'abattage). Dans un premier temps, il s'agit de valider l'hypothèse d'un impact du stress thermique pendant la gestation sur la physiologie, le métabolisme, les performances (notamment sur le dépôt de tissus gras) et les réponses de thermorégulation des descendants. Dans un second temps, il s'agira d'évaluer si ces effets sur la descendance sont liés à des phénomènes épigénétiques.

Un total de 32 femelles réparties en 2 lots de 16 animaux sera mis à la reproduction dans l'objectif d'avoir 24 truies pleines (12 truies primipares et 12 truies multipares). Du 7^{ème} au 110^{ème} jour de gestation, le lot expérimental sera soumis à un challenge thermique chronique cyclique (28-34°C) et le lot témoin sera élevé dans des conditions thermo-neutres (18-24°C). De la naissance à la sortie du post sevrage, les descendants des femelles des 2 lots seront élevés de manière conventionnelle dans des conditions thermiques thermo-neutres. En engraissement, 96 animaux (48 mâles entiers et 48 femelles) seront logés en collectif (12 porcs/loge) dans des conditions thermoneutres. 48 animaux (2 salles avec 8 loges de 3 animaux) seront mutés dans des salles climatiques pour mesurer leur performance et les réponses de thermorégulation face à un stress thermique. Le challenge thermique appliqué sur ces animaux sera similaire à celui appliqué sur les mères pendant la gestation. Au final nous utiliserons 176 animaux dans ce projet, 32 truies et 144 descendants à contrôler.

Règle des 3R. Le remplacement n'est pas possible car l'utilisation d'animaux est inhérente au type d'étude (impact d'un challenge thermique prénatal sur les performances et les réponses physiologiques à la chaleur des porcs charcutiers). En engraissement, nous avons réduit le nombre d'animaux au minimum statistique en fonction des mesures effectuées. Enfin, toutes les mesures seront réalisées par du personnel formé et expérimenté. Les animaux bénéficieront d'un suivi très proche par les animaliers ainsi que par les différents intervenants. Toute intervention potentiellement douloureuse ou stressante sera contrôlée, et les animaux suivis dans les minutes ou heures qui suivent. En cas de souci de santé, le vétérinaire sera consulté et les animaux traités en conséquence.

10067 L'objectif de ce projet est la production de S9 qui est une fraction microsomale servant de système d'activation métabolique, utilisé dans les études in vitro réalisées (OCDE 471, 473, 476, 487) pour la génération de données sur les produits à étudier (médicaments, produits chimiques, etc.) avant d'entreprendre des études de toxicologie (plus longues et nécessitant plus d'animaux) obligatoires afin d'établir les dossiers de demande d'autorisation à fournir aux autorités d'enregistrement.

Dans ce protocole, 6 animaux par lot (rat, souris ou hamster) sont soumis à un traitement unique par de l'Aroclor 1254 qui est un inducteur enzymatique. Les organes d'intérêt (foie et/ou rein) sont prélevés 5 jours après le traitement afin de récupérer des fractions microsomales qui serviront de système d'activation enzymatique dans les études in vitro.

Les fractions microsomales de rat ou souris sont les plus communément utilisées. Les fractions microsomales de hamster sont utilisées pour des produits ayant un métabolisme particulier (par exemple induction d'amines aromatiques).

Il n'existe pas de texte réglementaire mais l'utilisation de S9 est indiquée dans les lignes directrices de la majorité des tests utilisés (OCDE 471, 473, 476, 487) et la préparation est décrite dans de nombreuses publications.

Il n'existe aucune méthode alternative réglementaire à l'utilisation des animaux.

6 animaux par lot sont utilisés, entre 6 et 8 lots sont nécessaires selon les besoins en S9, soit entre 36 et 48 animaux par espèce. 1 fabrication annuelle maximum par espèce. Soit 144 animaux par an au maximum (48 rats, souris et/ou hamster) et 720 animaux sur 5 années d'autorisation de projet (240 rats, souris et/ou hamster) sur 5 années d'autorisation de projet.

Le traitement par l'Aroclor n'induit pas de stress ou de douleur. Après traitement, un suivi comportemental et pondéral des animaux est effectué. Tout animal montrant des signes cliniques modérés ou intenses fait l'objet d'une euthanasie.

10068 Le Syndrome Dysgénésique et Respiratoire Porcin (SDRP) est une affection virale présente au niveau mondial dans toutes les zones à forte densité porcine. Cette maladie provoque des troubles de la reproduction chez les femelles gestantes et chez les animaux en croissance une baisse des performances et des symptômes respiratoires. La lutte contre le virus du SDRP (SDRPV) fait essentiellement appel à des vaccins vivants atténués (Modified Live Vaccine : MLV).

Au cours d'une précédente étude sur des porcelets exempts d'organismes pathogènes spécifiques (EOPS), nous avons montré que la vaccination SDRP à l'aide d'un MLV administré par voie intradermique (ID) permettait de diminuer de 10 fois la transmission virale suite à une épreuve virulente. Lors d'une étude récente nous avons évalué l'efficacité du même vaccin SDRP administré par voie intramusculaire (IM) à des porcelets issus d'un élevage de terrain. Au cours de cette étude, nous avons pu mettre en évidence 2 différences importantes par rapports aux résultats de la première étude :

1/ Chez les porcelets issus du terrain, la réplication de la souche vaccinale a été inhibée pour une proportion importante d'animaux, ce qui a induit une absence de réponse immunitaire à la vaccination. Les investigations complémentaires ont mis en évidence un taux élevé d'Interféron alpha (IFNa) chez ces porcelets au moment de la vaccination qui pourrait être à l'origine de l'absence de réplication du MLV. L'augmentation du taux d'IFNa semblerait par ailleurs être liée à une infection par le virus Influenza Porcin

2/ Pour les porcelets qui avaient répondu correctement au vaccin IM, l'effet de la vaccination sur la transmission virale a été bien plus faible (diminution de 2x de la transmission virale) que chez les porcelets EOPS vaccinés par voie ID. Il semblerait donc que la voie de vaccination puisse aussi influencer l'efficacité de la vaccination.

Dans ce contexte, les objectifs du présent projet sont :

- D'évaluer l'effet d'une infection par le virus Influenza Porcin sur la vaccination SDRP à l'aide d'un MLV. Pour ce faire, nous mettrons en place une première procédure impliquant 24 porcelets

- D'évaluer l'effet de la voie d'administration (IM ou ID) d'un vaccin MLV sur la réponse immunitaire et sur l'efficacité du vaccin. Pour répondre à cet objectif, nous mettrons en place une seconde procédure impliquant 56 porcelets.

Au total, 80 porcs seront nécessaires. Le nombre d'animaux a été réduit au maximum tout en permettant l'obtention de données fiables et exploitables. Les porcs seront élevés en groupe 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. Afin de diminuer l'inconfort des animaux, les prélèvements stressants (lavages broncho-alvéolaires) seront réalisés sous sédation. En cas d'atteinte de points limite préalablement définis, les porcs seront euthanasiés afin qu'ils ne souffrent pas.

Ce travail permettra de mettre en évidence les facteurs qui peuvent moduler l'efficacité de la vaccination SDRP sur le terrain et ainsi à termes de définir des protocoles de vaccination plus efficaces.

10069 Les fractures de l'os sont des traumatismes fréquents. En raison des propriétés régénératives du tissu osseux, le réalignement et le maintien du membre après une fracture suffisent généralement à générer du nouveau tissu grâce au phénomène d'ostéogenèse. Malgré cela 8% des cas de fractures aboutiront à une non consolidation osseuse. Plusieurs protocoles mettant en œuvre l'ostéo-induction sont proposés comme la greffe cortico-spongieuse autologue, l'injection percutanée de moelle osseuse concentrée autologue et les BMP (Bone Morphogenetic Proteins) introduites sur des supports implantables biocompatibles. Les BMPs sont des glycoprotéines généralement libérées par acidification de la trame osseuse (résorption), ou lors d'une fracture. Elles ont été utilisées dans le domaine de la consolidation osseuse et commercialisées sous les noms d'Osigraft®, Inductos® et Infuse® Bone Graft. A cause de leurs effets indésirables ainsi que l'absence d'une bonne pratique de fabrication du support, la production des Osigraft® et Inductos® a été arrêtée en 2016 en Europe.

Comme alternative aux BMPs, nous avons choisi de travailler sur un disaccharide (DP2) présentant une activité pro-calcifiante sur des cellules ostéoblastiques murines et humaines in vitro. Nous souhaitons tester 2 concentrations différentes du disaccharide déposé sur 3 types de supports

différents : un support de type collagène bovin de type I, (identique aux supports des BMPs), un support de type à base d'hydroxyapatite et de phosphate tricalcique (appelé BCP), et un support composite alliant un hydrogel et du BCP). Ces trois supports sont connus pour leur biocompatibilité. Afin d'optimiser le couple {support ; DP2}, il convient d'évaluer la stabilité de ce couple, la toxicité de la molécule, sa résorption, la bonne capacité de relargage du principe actif (diffusion lente), le comportement à long terme et les propriétés fonctionnelles (la formation de nouveaux os). De ce fait, notre objectif est de développer un modèle de perte de substance osseuse au niveau du crâne pour étudier les effets de DP2 supporté sur la réparation osseuse en tenant compte des effets du microenvironnement et des conditions physiologiques.

Le choix du modèle animal s'est porté sur le rat qui est très utilisé comme modèle murin pour réaliser un défaut osseux au niveau de la boîte crânienne. Le modèle de défaut crânien a été choisi par rapport à un autre os (comme le fémur ou l'humérus) principalement pour les raisons suivantes : c'est un os plat, il permet l'établissement d'un défaut uniforme et reproductible qui est facilement évalué par analyse radiographique et histologique; sa localisation anatomique reflète une facilité d'accès et une taille adéquate pour réaliser deux défauts osseux par rat dont un servira de contrôle, ce qui nous permettra de réduire le nombre d'animaux; et le modèle a été largement utilisé et étudié permettant une comparaison précise des couples greffés.

La demande d'autorisation porte sur une durée de 18 mois avec un nombre de rat utilisé de 120. Pour cette étude, nous aurons besoin de 10 rats par lot (12 lots) pour obtenir des tests statistiquement significatifs. Toutes les démarches réglementaires seront entreprises pour que ces travaux soient réalisés dans de bonnes conditions pour l'animal. Nos expériences sont planifiées en assurant le bien-être des animaux comme la prise en charge de la douleur et l'anesthésie. Les animaux bénéficieront d'un environnement adapté enrichi ainsi qu'un suivi quotidien.

10070 Les papillomavirus humain (HPV) sont responsables de nombreux cancers. Parmi ces derniers, le cancer du col de l'utérus possède la plus forte morbidité. Il est le second cancer le plus fréquent chez la femme avec environ 500 000 nouveaux cas diagnostiqués et environ 274 000 décès par an. Parmi les 200 types de HPV identifiés, ceux de type 16 et 18 sont classés à haut risque puisqu'ils sont associés à environ 80% des cancers du col de l'utérus. Il existe actuellement des vaccins commercialisés contre les HPV de type 16 et 18. Cependant, ils ne sont pas efficaces si l'infection HPV est déjà présente. C'est pourquoi de nouveaux candidats vaccins dits thérapeutiques sont nécessaires pour les personnes infectées par HPV-16 et HPV-18 afin de réduire la survenue de cancer du col de l'utérus.

Notre projet a pour but d'évaluer chez un modèle primate des candidats vaccins thérapeutiques qui ont déjà montré leur efficacité in vitro et chez le rongeur. Aujourd'hui, aucun dispositif in vitro ne permet de reproduire la complexité d'une réponse immunitaire au niveau d'un organisme entier, il est donc nécessaire de recourir à un modèle animal. Le modèle primate est le seul modèle animal permettant l'étude de la réponse vaccinale anti-HPV dans un contexte physiologique proche du contexte humain (réponses immunitaires et structure du tractus reproducteur [Utérus/col/vagin]) semblables chez la femme et le primate non humain (PNH).

Au maximum 32 animaux nés et élevés à des fins scientifiques dans des élevages agréés seront inclus dans le projet. En accord avec la règle des 3R, le nombre d'animaux dans chacun des groupes expérimentaux a été ramené au minimum compatible avec l'utilisation de tests statistiques pour analyser les données. Les méthodes expérimentales (prélèvements sanguins et tissulaires) ont été choisies de façon à éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux (limitation des volumes sanguins prélevés; prélèvements sanguins, biopsies tissulaires, injections intramusculaires des vaccins réalisés sous anesthésie générale). Des critères d'arrêt sont prévus afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus. En cas d'apparition de tels effets, le vétérinaire de l'installation sera alerté et mettra en œuvre des traitements appropriés. Les animaux seront hébergés au minimum par deux dans des modules contigus permettant des interactions sociales. Les animaux bénéficieront d'un programme défini par la cellule « bien-être animal » de l'établissement pour l'enrichissement de leur milieu de vie.

10071 La toxoplasmose est causée par le parasite apicomplexe *Toxoplasma gondii*. Chez l'homme adulte, la primo-infection passe le plus souvent inaperçue. Cependant, un lien est maintenant bien documenté entre une sérologie positive et les maladies mentales comme la schizophrénie. De plus, chez la femme enceinte, une primo-infection sera dommageable au fœtus avec par exemple, des avortements spontanés ou des séquelles oculaires plus ou moins graves chez les enfants. A ce jour, même si les traitements médicamenteux sont efficaces contre la forme proliférative du parasite et permettent de contrôler la dissémination parasitaire, ils occasionnent de nombreuses réactions secondaires (fièvre, éruptions cutanées, érythèmes). De plus, aucun traitement contre la forme chronique n'est disponible sur le marché. Le but de l'étude est de tester in vivo une nouvelle molécule, démontrée efficace pour limiter la prolifération in vitro du parasite, afin de déterminer son action lors des phases aiguë et chronique de l'infection. Nous avons déjà démontré que la molécule est peu toxique pour des lignées cellulaires ou des cellules primaires in vitro et qu'elle inhibe très efficacement la prolifération parasitaire in vitro. Nous avons ainsi estimé son index thérapeutique (rapport : dose létale à 50% / dose efficace à 50%) à 300, ce qui est en faveur d'un faible risque de toxicité in vivo.

En parallèle, pour savoir comment se distribue la molécule dans l'organisme nous avons souhaité la marquer avec un isotope radioactif afin de réaliser des images scintigraphiques. Dans un premier temps la molécule radiomarquée sera donnée par voie orale, comme lors du traitement proposé, et un suivi longitudinal sera réalisé afin de suivre sa biodistribution in vivo chez des souris saines. Ensuite, en fonction des résultats obtenus la même étude sera réalisée chez des souris infectées par le parasite.

Le projet est mis en œuvre dans un établissement utilisateur agréé. Tous les personnels impliqués ont des compétences validées pour les manipulations des animaux.

Pour la toxoplasmose, la souris est un modèle approprié et bien validé. Au total, 24 souris seront incluses dans ce protocole. Tout au long du protocole in vivo, nous respecterons la règle des 3R (Remplacer, Réduire et Raffiner). Nous limiterons le projet aux seules expériences considérées comme indispensables chez l'animal. Ainsi, le nombre minimum d'animaux permettant le recueil de données statistiquement exploitables sera utilisé. Les souris seront hébergées par groupe, avec enrichissement du milieu de vie. Les animaux seront suivis quotidiennement afin de contrôler leur bien-être. Le protocole d'imagerie qui sera mis en œuvre n'entraînera pas de douleur, souffrance ou angoisse en dehors d'un stress bref et modéré lié aux injections du radiotraceur selon les bonnes pratiques vétérinaires. L'acquisition des images est réalisée sous anesthésie générale et a une durée limitée ; les animaux retourneront dans leurs cages entre deux sessions d'acquisition. Pour les souris infectées, plus fragiles, une seule session d'imagerie sera réalisée au temps défini à la fin des expérimentations chez les souris saines.

10072 La sclérose latérale amyotrophique (SLA), ou maladie de Charcot, est une maladie neurologique progressive et dévastatrice conduisant à une défaillance progressive du système neuromusculaire et à la mort par insuffisance respiratoire. La perte de motricité est la conséquence d'une dégénérescence des motoneurones, les cellules nerveuses qui commandent les muscles volontaires. C'est la plus fréquente des maladies du motoneurone chez l'adulte. Dans la majorité des cas, la maladie est sporadique, c'est-à-dire qu'elle atteint une personne de manière isolée. Cependant, dans 5 à 10% des cas, la SLA peut toucher plusieurs membres d'une même famille, on parle de SLA « familiale ». Récemment, un nouveau gène responsable de SLA familiales et sporadiques a été identifié. A ce jour, aucun traitement n'est disponible contre la SLA. Il est donc primordial de mieux comprendre cette pathologie, et notamment les mécanismes responsables de la mort des motoneurones, dans l'optique à plus long terme de développer des recherches à visée thérapeutique.

Un modèle murin porteur d'une mutation du gène a été produit. Notre projet de recherche a pour objectif de comprendre les mécanismes biologiques, biochimiques et neurologiques aboutissant à la mort des motoneurones.

Dans un but de remplacement, des expériences ont été réalisées précédemment sur des muscles et des fibroblastes de patients porteurs de mutations de ce gène. Ces expériences ont montré que les troubles cliniques de SLA chez l'homme n'étaient pas limités au système nerveux central et que

d'autres tissus, tels que les muscles, étaient affectés. Ces anomalies ne sont pas détectables dans des cellules en culture. Seul un modèle animal permettra d'appréhender tous ces aspects : effets de notre mutation d'intérêt dans différents tissus et à différents âges.

Dans un but de réduction du nombre d'animaux à utiliser pour cette étude, des statistiques prédictives ont été réalisées dans le but d'utiliser le minimum d'animaux nécessaires.

Dans un but de raffinement, l'utilisation d'une grille d'observation (correspondant au phénotype clinique de SLA) permettant un suivi optimal des animaux sera mise en place. Une observation quotidienne de la nourriture et boisson ainsi que de l'état des animaux sera effectuée. En cas d'altération de l'état de l'animal, un avis vétérinaire sera demandé. Une euthanasie pourra être pratiquée, après consultation du vétérinaire.

S'agissant d'une première caractérisation de ce modèle récemment créée. Nous prévoyons un ensemble de tests sur 32 animaux expérimentaux, 8 animaux contrôles, 8 animaux mutés pour le gène, pour chacun des sexes. De plus, nous prévoyons une étude sur des caractéristiques annexes, étant donné qu'il s'agit d'une première opportunité de documenter les effets possibles de la mutation sur des animaux.

10073 Le système musculaire nous permet de respirer, marcher, manger, sourire. Les muscles squelettiques s'atrophient au cours du vieillissement, lors d'hospitalisation prolongée, au cours du cancer, et dans nombreuses myopathies d'origine génétique. C'est le cas par exemple de la myopathie de Duchenne où les fibres musculaires sont en perpétuel renouvellement. Lors de ce renouvellement, les cellules souches du muscle, appelées cellules satellites (CS) sont recrutées pour tenter de réparer la fibre. Lors d'exercices intenses les fibres musculaires peuvent aussi se casser, et là aussi, les CS réparent les fibres endommagées. La compréhension des mécanismes qui président à la formation des CS et ensuite chez l'adulte à leur maintien est fondamentale pour tenter un jour d'intervenir sur ces cellules en modulant leurs propriétés. Il existe plusieurs types de fibres musculaires aux propriétés de contraction et d'endurance lors de l'effort bien distinctes et qui sont plus ou moins vulnérables dans différents types de pathologie ou au cours du vieillissement. La plupart de ces situations ne peuvent pas être reproduites in vitro ou ex vivo. Mais nous disposons de différents modèles de souris génétiquement modifiées permettant d'étudier les mécanismes qui président à l'engagement des cellules pluripotentes dans la voie myogénique, la genèse des cellules souches musculaires, la spécialisation des différents types de fibres musculaires squelettiques ainsi que l'implication de leurs CS.

524 souris sont nécessaires pour mener à bien notre projet et permettre l'analyse statistique des différences observées. Différents types de lésion musculaire seront induits sous anesthésie générale à des souris présentant différents génotypes. Pour chaque protocole nous comparerons ces animaux à différents temps au cours du processus de régénération (4 jours à 30 jours maximum après la lésion) pour comprendre comment se met en place ce mécanisme.

Pour respecter la règle des 3R, toutes les expériences qui peuvent être menées en culture seront réalisées en remplacement des protocoles sur l'animal, et la mise au point de modèles cellulaires adéquats fait partie intégrante de notre projet. Le nombre d'animaux sera réduit au minimum. Les animaux seront surveillés quotidiennement pendant toute la durée de l'expérience afin de déceler des signes de douleur. Nous avons défini les variables analysées et la méthode d'évaluation quantitative du point limite au-delà duquel les animaux recevront un analgésique ou seront euthanasiés.

En conclusion, les études menées amélioreront nos connaissances sur les propriétés des cellules souches musculaires. Nos études sur la plasticité musculaire devraient aussi nous permettre de mieux comprendre les bases de l'atrophie musculaire préférentielle de certains types de fibres musculaires observée au cours du vieillissement chez l'homme.

10074 L'addiction aux drogues est un problème majeur de santé publique puisqu'elle se traduit par une morbi-mortalité importante. Mais c'est aussi est un formidable défi pour la recherche thérapeutique, étant donné le peu de traitements disponibles. De plus lorsque ces traitements existent, leur efficacité est insuffisante pour prévenir les rechutes, qui restent le problème principal dans le traitement des addictions en général. Ainsi, l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques est

nécessaire pour trouver de nouveaux traitements efficaces dans cette pathologie. Le but de ce projet est d'évaluer le rôle d'un certain type de récepteurs cérébraux (récepteurs du glutamate) dans l'addiction chez la souris grâce à une nouvelle molécule capable de stimuler ces récepteurs.

Grâce à des études comportementales (évaluation des effets addictifs des drogues nous évaluerons la capacité de la nouvelle molécule à bloquer les effets de la cocaïne. Nous évaluerons également la possibilité que cette molécule puisse altérer certains comportements (mémoire, évaluée pour le test du labyrinthe en Y ou l'hédonie, mesurée par la consommation d'eau sucrée) lors d'un traitement répété. Ces informations sont indispensables dans le cadre d'une future stratégie thérapeutique. Enfin, nous mesurerons la libération de neurotransmetteurs dans le cerveau suite à l'administration de cocaïne et déterminerons si cette libération est modifiée par l'administration de la nouvelle molécule. Ces dernières expériences vont permettre de comprendre comment cette molécule modifie le mécanisme d'action de la cocaïne.

Ce projet ayant pour but d'étudier des phénomènes psychiatriques, les méthodes alternatives actuelles sont insuffisantes. Les modifications cérébrales et comportementales complexes étudiées s'inscrivent dans le cadre d'une étude intégrée et doivent donc être réalisées chez des animaux.

Pour réduire le nombre d'animaux, nous avons estimé la taille des échantillons permettant une analyse statistique efficace des résultats grâce aux données collectées au cours d'expériences précédentes. Le nombre total de souris nécessaire à la réalisation de ce projet est de 2304 pour une durée de 5 ans. De plus, lorsque c'est possible, des expériences seront réalisées de manière longitudinale (chaque animal est son propre témoin) permettant encore de réduire le nombre d'animaux. Ce projet met en jeu des procédures d'étude comportementales l'administration de substances à action psychotrope. Il met également en jeu des procédures chirurgicales réalisées sous anesthésie et qui implique un traitement par un anti-inflammatoire non stéroïdien et une surveillance quotidienne des animaux.

Ce projet va permettre de valider une nouvelle cible thérapeutique dans le traitement de l'addiction à cocaïne, pathologie pour laquelle il n'existe actuellement aucun traitement spécifique.

10075 Depuis 2005 et l'émergence du virus Chikungunya (CHIKV) à l'île de la Réunion, des épidémies d'infection à Chikungunya se sont propagées dans le monde entier via des cas importés et par des cycles d'amplification dans les pays tempérés tel qu'en Italie en 2007 et en France en 2010 et 2014. Depuis 2010, des épidémies de Chikungunya ont eu lieu dans plus de 70 pays pour un total de plusieurs millions de cas (1,5-3 millions en Inde et autant en Amérique du Sud ou aux Antilles). La pathologie aiguë peut conduire à la mort dans 0,2% des cas et cela surtout chez les personnes âgées et les bébés infectés à la naissance. La complication majeure reste l'évolution vers une maladie chronique associée à une persistance du virus dans les tissus. Cette chronicisation a un impact économique et sanitaire important. Ainsi, à La Réunion, 12 ans après l'épidémie, 5 à 10% des personnes infectées ont encore des séquelles. La prise en charge des patients reste aujourd'hui exclusivement centrée sur la surveillance et les traitements symptomatiques : antalgiques, antipyrétiques, maintien des fonctions essentielles.

Il n'existe pas à l'heure actuelle de traitement antiviral spécifique de l'infection et si de nombreux candidats vaccins ont été étudiés, seuls quelques-uns ont dépassé le stade de l'évaluation préclinique pour des essais chez l'homme.

Notre programme est destiné à compléter l'évaluation préclinique d'un vaccin contre le virus Chikungunya chez les primates non humains (PNH), modèle le plus pertinent de l'infection de l'homme par le CHIKV, pour permettre son évaluation chez l'homme ainsi que nous l'avons démontré en mettant en évidence l'identité de la maladie et de la réponse immune du PNH et de l'homme exposé au Chikungunya.

Le projet prévoit au maximum 68 PNH nés et élevés à des fins scientifiques dans des élevages agréés. Le nombre d'animaux dans chacun des groupes expérimentaux est réduit au minimum nécessaire tout en restant compatible avec l'utilisation de tests statistiques pour permettre l'interprétation des résultats. Il s'agit ici de vérifier l'absence de persistance de composants du vaccin après administration et de valider la présence de réponse immune protectrice dans les sérums de volontaires humains vaccinés dans une étude de phase I. Les méthodes expérimentales

ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux : injections et prélèvements de sang et biopsies sous anesthésie, limitation des volumes de sang prélevés.

En cas d'apparition d'effets inattendus, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés. Des critères d'arrêt de procédure sont prévus dans le projet. Les animaux seront hébergés en groupe avant infection, puis en hébergements individuels contigus permettant des interactions sociales visuelles, auditives et olfactives. Ils bénéficieront du programme d'enrichissement défini par la cellule de l'établissement en charge du bien-être animal. Des échantillons biologiques produits dans ce projet seront partagés avec d'autres laboratoires afin de limiter le recours au modèle PNH.

10076 Les maladies cardiovasculaires ischémiques constituent l'une des premières causes de décès dans les pays développés. L'infarctus du myocarde est déclenché par l'obstruction de l'artère coronaire qui alimente le cœur en sang et donc en oxygène. Sans l'oxygène, les cellules du muscle cardiaque (myocarde) meurent rapidement en entraînant des troubles du rythme, une insuffisance cardiaque, voire l'arrêt du cœur. La rapide reperfusion de la zone affectée est essentielle pour réduire les conséquences de l'infarctus.

Un processus physiologique permettant la reperfusion est de favoriser la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. Les microvecteurs (MV), petites vésicules synthétiques (sMV) ou naturels (nMV) portant à leur surface un marqueur spécifique sont capables d'améliorer la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir du réseau sanguin préexistant permettant la reperfusion, diminuent la mort cellulaire par apoptose des cellules constituant les vaisseaux sanguins comme les cellules endothéliales.

L'objectif de ce projet est de déterminer si les MV sont capables de limiter les séquelles de l'obstruction de l'artère coronaire en les injectant le plus tôt possible après un infarctus du myocarde.

Nous allons également constituer un groupe de rats témoin qui recevront les mêmes procédures expérimentales afin d'obtenir des contrôles non traités. Quatre doses des MV seront testées.

Le modèle de ligature de l'artère coronaire chez le rat sera utilisé. Pour cette étude un total de 180 animaux (9 groupes de 20 rats) sera utilisé. Pour ce projet les principes de remplacement, de réduction et de raffinement seront respectés.

L'induction de l'ischémie du myocarde a un caractère de stricte nécessité et ne peut pas être remplacée 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=20 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.

De plus, pendant les différentes procédures expérimentales, le recours aux anesthésiants, analgésique, anti-inflammatoire, au renforcement positif (l'entraînement à la coopération) ainsi que l'utilisation de tapis et lampe chauffants sera primordiale pour soulager l'inconfort, la douleur et la détresse des animaux.

Une grille présentant les points limites sera utilisée pour déterminer la conduite à tenir.

Ces données devraient permettre de mieux comprendre les mécanismes protecteurs des MV et envisager leur utilisation en thérapeutique.

10077 Les effets de l'exercice physique sur l'immunité ont largement été étudiés chez le sujet sportif mais peu de données sont disponibles sur les liens physiologiques entre exercice et inflammation de la moelle épinière. L'exercice physique de haute intensité induit une inflammation et un stress oxydant systémique et musculaire. Il peut également modifier les défenses du système immunitaire inné. Le facteur de transcription Nrf2 est connu pour son rôle majeur dans la régulation des réponses anti-oxydantes et anti-inflammatoires. L'activation de la voie Nrf2 par un agent pharmacologique comme le sulforaphane (SFN) est utilisée pour lutter contre le stress oxydant et l'inflammation. Notre objectif

est d'étudier l'effet du SFN sur l'inflammation de la moelle épinière après 2 jours d'exercice aigu intense chez la souris sauvage C57BL/6J.

Pour cette étude, il est nécessaire d'utiliser des animaux vivants. En respectant les règles des 3R, l'espèce choisie est la souris C57BL/6J. Pour le remplacement, cette espèce est capable de courir sur un tapis roulant et sera utile pour l'étude du rôle de l'exercice physique de haute intensité sur l'inflammation et le stress oxydatif de la moelle épinière. Pour la réduction, un nombre adéquat d'animaux minimum sera utilisé, soit au total de 120 souris pour atteindre des résultats statistiquement significatifs. Pour le raffinement, les animaux seront hébergés au maximum 5 souris par cage et des enrichissements seront ajoutés. Pour limiter le stress des animaux en exercice de haute intensité, nous utiliserons le refus de course comme un point limite pour arrêter le protocole. Ce projet permettra une meilleure compréhension de l'effet de la voie de signalisation Nrf2 sur l'inflammation et le stress oxydant dans la moelle épinière chez la souris.

10078 La cryptosporidiose est une maladie parasitaire intestinale du nouveau-né induite par des organismes du genre *Cryptosporidium* sp entraînant des diarrhées plus ou moins sévères pouvant conduire à la mort des animaux. Cette maladie est responsable de pertes conséquentes en élevage et constitue un problème de santé publique important du fait de son caractère zoonotique. Le contrôle de cette parasitose est de ce fait un enjeu majeur pour améliorer la santé animale et humaine.

Chez les bovins, *Cryptosporidium parvum* induit des diarrhées entre 4 et 20 jours de vie. Aucune méthode de contrôle n'est actuellement disponible pour abolir ou limiter les conséquences physiopathologiques sur les jeunes animaux (diarrhée, défaut de croissance, mal-être). L'amélioration des structures intestinales par supplémentation dès la naissance pourrait permettre de limiter l'impact de cette parasitose sur la santé des animaux infectés. Dans le présent projet, l'impact de l'utilisation d'additifs alimentaires dans la ration quotidienne, depuis la naissance jusqu'à 18 jours de vie, sur une infection à *Cryptosporidium parvum* sera évaluée sur 18 veaux mâles de race Holstein. Trois groupes d'animaux seront considérés : 6 veaux infectés non supplémentés, 6 veaux supplémentés avec le combo 1, 6 veaux supplémentés avec le combo 2.

La règle des 3 R sera strictement respectée.

Remplacement : Le projet vise à étudier des additifs alimentaires ayant un effet positif sur la structure intestinale et donc indirectement sur l'infection parasitaire. Il n'est donc pas envisageable de réaliser ces tests in vitro.

Réduction : Le design expérimental a été établi pour réduire au maximum le nombre d'animaux inclus dans le protocole, compte tenu d'une étude précédente ayant montré des résultats significatifs avec 6 veaux par traitement. Nous incluons donc 6 veaux par groupe, soit 18 veaux.

Raffinement : Les veaux seront hébergés en conditions contrôlées A2 du fait du caractère zoonotique de l'agent pathogène étudié. Afin de limiter le stress des manipulations pour les prises de température, les veaux seront équipés de capteurs de température ruminiaux permettant un suivi en continu de la température corporelle et une réaction précise à une éventuelle hypothermie. Afin d'enrichir l'environnement des veaux, des brosses seront mises à leur disposition et la radio sera allumée dans la salle

10079 Le sepsis, conséquence grave des septicémies, est l'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 de pronostic majeur. 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 fréquente pendant les 10 premières années après leur sortie de réanimation.

La survenue d'un premier choc de type traumatique ou hémorragique semble favoriser l'apparition d'une infection chez 30% des patients, ce qui peut augmenter les risques de survenue d'un sepsis. 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. Les objectifs sont la caractérisation des atteintes de l'encéphale après un choc traumatique simple et après un double choc traumatique puis septique ou inflammatoire, l'étude de leur mécanisme d'apparition, et la mise en évidence d'une sensibilisation à un choc septique ou inflammatoire après un premier choc traumatique.

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 dans le monde.

Dans le cadre de ce projet nous utiliserons des modèles murins transgéniques ou non, avec un total de 7590 animaux sur une période de 5 ans, afin de réaliser quatre 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 utiliserons en particulier des souris génétiquement modifiées permettant de visualiser plus facilement les cellules immunitaires résidentes du cerveau, ce qui permet 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/analgesie pour toutes les manipulations qui seront effectuées, 3) des points limites permettant de mettre fin à l'expérimentation sur l'animal par une euthanasie, 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.

10080 Le syndrome de Costello (CS) apparaît dans les premiers mois de la vie et se caractérise par un retard de croissance postnatale, des traits épais, un déficit intellectuel et des altérations au niveau de la peau, des muscles et du cœur. Environ 60% des malades souffrent de troubles cardiaques responsables du décès de nombreux enfants.

Notre objectif est d'élucider les mécanismes responsables du syndrome de Costello causés par une mutation dans le gène HRAS, et d'apporter des solutions thérapeutiques pour limiter le développement de troubles cardiaques chez le jeune enfant et chez l'adulte. Pour atteindre ces objectifs de recherche fondamentale et médicale nous disposons d'un nouveau modèle murin de la maladie. Ce modèle a fait l'objet d'une première analyse qui a révélé une hypertension associée à une accélération du rythme cardiaque et le développement de troubles de la fonction du cœur. La souris mutée présente aussi une faiblesse musculaire généralisée et des anomalies au niveau du métabolisme énergétique ce qui en fait un modèle idéal pour étudier ce syndrome qu'on ne peut remplacer par des techniques alternatives in vitro par exemple.

Ce projet vise donc à étudier en détail les mécanismes responsables des troubles cardiaques et musculaires dans la souris modèle du syndrome de Costello, ainsi qu'à les réduire à l'aide d'un médicament déjà autorisé chez l'homme dans le traitement de l'hypertriglycéridémie. Ce médicament rétablit aussi certains défauts du métabolisme énergétique comme ceux observés dans la souris modèle du syndrome de Costello dans notre laboratoire. Afin de progresser vers le repositionnement de cette molécule dans le traitement des troubles cardiaques dans le syndrome de Costello nous devons évaluer son action sur un modèle de la maladie (in vivo). Pour cela, le modèle murin du syndrome de Costello dont nous disposons est indispensable et parfaitement adapté à nos besoins.

Ce projet se fera dans le respect de la règle des 3R :

REMPLACEMENT : Il est indispensable de travailler sur un modèle murin car la cardiomyopathie est une maladie d'adaptation du cœur au sein d'un organisme, et il n'est pas possible de réaliser cette étude sur un modèle de lignée cellulaire (in vitro) car la cardiomyopathie ne pourra pas se développer.

REDUCTION : Nous demandons pour réaliser l'ensemble de nos expériences un total de 360 animaux. Nous combinerons nos lots témoins dans le but de restreindre le nombre d'animaux.

RAFFINEMENT : Afin de respecter la notion de raffinement, le bien-être de nos animaux sera pris en compte de leur naissance à leur mort. Pour cela un suivi quotidien sera réalisé par le personnel de l'animalerie et un enrichissement des cages sera proposé à l'aide de nids afin de réduire le stress et satisfaire les instincts naturels de la souris. Les souris seront hébergées en cages ventilées animalerie et suivies quotidiennement pour détecter d'éventuels signes cliniques. Et enfin, lorsque nécessaire et pour éviter tout stress comme lors d'une prise de sang, les procédures seront réalisées sous anesthésie générale.

Ce projet s'inscrit donc dans une recherche thérapeutique contre les maladies rares avec des implications à plus long terme en santé humaine. Ce projet a été préalablement évalué par les instances scientifiques qui l'ont financé. La présente saisine comporte ainsi des implications à la fois sur le plan fondamental pour la compréhension du rôle biologique du gène HRAS mais aussi en santé humaine dans le cadre des maladies rares et de leur traitement.

10081 Ce projet a pour objectif d'évaluer d'un point de vue pharmacodynamique différents lots de formulation prolongée de molécules approuvées chez l'homme. Il s'agit d'un test réglementaire (décrit dans les dossiers d'AMM) de contrôle qualité chez l'animal indispensable pour la libération de produits pharmaceutiques à libération prolongée pour traiter des patients atteints de certaines pathologies dans les domaines de l'oncologie et de l'endocrinologie.

Les formulations à libération prolongée de certaines molécules sont prescrites aux patients afin de limiter le nombre d'injections à réaliser. Il est primordial de vérifier la conformité de chaque lot de ces formulations en termes de cinétique et taux de diffusion avant l'administration aux patients. Cette vérification, exigée par les autorités réglementaires, est majoritairement réalisée par des tests in vitro.

Cependant, les autorités de certains pays n'ont pas encore approuvé cette méthode de substitution in vitro et exigent donc encore la validation des lots par la méthode in vivo historiquement approuvée. Des discussions sont en cours auprès de ces autorités pour faire approuver au plus vite cette méthode de remplacement in vitro et ainsi éviter le recours aux animaux : 4 pays concernés UE et hors UE.

Pour ce faire, les différents lots de produit sont injectés à des rats, puis des mesures sont réalisées à différents temps à partir de prélèvements sanguins (mesure des concentrations de produits dans le sang, et de certains biomarqueurs d'efficacité).

Le besoin annuel est de 400 animaux, soit 2000 animaux pour la durée totale du projet (5 ans).

Les injections sont réalisées sous anesthésie générale et les volumes et fréquence de prélèvement sont planifiés de manière à ne pas affecter l'état général des animaux ni induire de stress, selon les recommandations spécifiques existantes.

Les animaux sont maintenus en groupes sociaux dans un milieu enrichi avec du matériel de nidification ainsi que des tunnels. Une observation journalière des animaux est réalisée depuis leur réception jusqu'à la fin de l'étude, et des points limites sont mis en place, afin de garantir leur bien-être tout au long de l'étude. En fonction du type de produit (3 dosages différents existent), des groupes de 6, 12 ou 18 rats seront utilisés.

10082 La grippe et les surinfections bactériennes représentent un problème de santé publique. Notre objectif est de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la surinfection bactérienne post-grippale afin de proposer de nouvelles méthodes prophylactiques et/ou thérapeutiques. Nous nous concentrons particulièrement sur les mécanismes responsables de l'immunosuppression et dont on sait qu'ils favorisent les infections secondaires. Pour cela, nous utilisons un modèle expérimental murin qui est admis par la communauté scientifique.

Le microbiote intestinal joue un rôle important dans l'homéostasie du système immunitaire. Nos travaux récents montrent une perturbation importante de la composition du microbiote intestinal au cours de la grippe expérimentale. Cet effet s'accompagne d'une altération des fonctions métaboliques de ce dernier, révélée par une diminution de la production des acides gras à chaînes courtes (AGCC). Ces composés lipidiques jouent un rôle important dans de nombreux processus physiologiques (homéostasie/barrière intestinale, réponses inflammatoires et immunitaires). Certains AGCC semblent favoriser les mécanismes de défense contre les infections bactériennes.

Notre hypothèse est que la baisse brutale des AGCC au cours de la grippe participe aux surinfections bactériennes. Pour tester cette hypothèse, des expériences de transfert de flore seront réalisées chez des souris préalablement traitées aux antibiotiques (afin de faciliter la colonisation). Chez les souris colonisées, nous analyserons la composition et la fonctionnalité du microbiote intestinal et les capacités de défense contre l'infection bactérienne (*Streptococcus pneumoniae*). Les mécanismes immunologiques sous-tendant la susceptibilité à l'infection bactérienne seront étudiés. Par ailleurs, nous développerons une approche interventionnelle basée sur l'utilisation de prébiotiques (supplémentation en AGCC, régimes riches en fibres) et de probiotiques (bactéries productrices d'AGCC) dans notre modèle de surinfection bactérienne post-grippale. Ce type de stratégie pourrait maintenir la production des AGCC au cours de la grippe et ainsi renforcer les mécanismes de défense contre les infections bactériennes ultérieures.

La demande concerne (i) l'infection des souris avec le virus grippal et la collecte du microbiote intestinal (caecum), (ii) la procédure de colonisation des souris, le suivi des souris colonisées et l'analyse des mécanismes immunologiques sous-tendant la susceptibilité à l'infection par le pneumocoque et (iii) l'effet des pré/probiotiques sur la surinfection bactérienne. Le mode opérationnel proposé dans cette demande est communément utilisé par la communauté scientifique travaillant sur le microbiote.

Ce projet expérimental répond aux exigences des 3R, à savoir remplacement, réduction et raffinement. Au total, 3504 souris seront nécessaires pour atteindre nos objectifs. Cette utilisation maximise les données obtenues à partir de chaque animal, afin de limiter ou d'éviter l'utilisation subséquente d'animaux supplémentaires, et ce, sans pour autant compromettre le bien-être animal. Si nécessaire, des modifications des procédures sont prévues au cours des expérimentations afin de réduire la douleur et la détresse ainsi que d'améliorer le bien-être animal. Les animaux sont manipulés individuellement afin de limiter tout stress des animaux non manipulés. Les souris ne sont pas soumises à des prélèvements répétitifs.

10083 L'immunité désigne la capacité de l'organisme à se défendre contre des substances étrangères, comme des agents infectieux, mais aussi contre ses propres constituants altérés, comme des cellules tumorales. Le système immunitaire est composé d'organes et de cellules, parmi lesquelles plusieurs types de lymphocytes jouent un rôle fondamental. Chez le sujet sain, ce système préserve la reconnaissance du soi. Une maladie auto-immune survient quand les mécanismes de tolérance au soi deviennent défaillants, permettant d'attaquer les constituants de l'organisme.

De nombreux travaux ont clairement établi que certaines populations de lymphocytes T jouent un rôle primordial dans le contrôle de la tolérance périphérique aux antigènes du soi et apparaissent essentiels pour l'inhibition des maladies auto-immunes telles que les gastrites, les thyroïdites, les maladies inflammatoires de l'intestin ou encore le diabète auto-immun spontané.

De ce fait, l'identification de facteurs modulant la génération ou les fonctions de ces cellules apparaît d'une importance cruciale. La régulation de l'homéostasie du fer pourrait être l'un de ces facteurs. En effet, le niveau de fer dans l'organisme, que ce soit une surcharge ou au contraire une carence, semble pouvoir affecter l'activation, le profil de différenciation ou la prolifération de différents acteurs du système immunitaire.

Des expériences récentes *in vitro* semblent clairement indiquer qu'une surcharge en fer serait délétère pour ce processus. A l'inverse, dans un milieu carencé en fer, on observe une augmentation des lymphocytes T régulateurs.

Au regard de ces résultats, nous souhaitons donc étudier l'effet du fer sur la génération et le maintien des fonctions effectrices des cellules T régulatrices périphériques *in vivo* chez l'animal.

Il existe de nombreuses lignées de souris génétiquement modifiées permettant d'induire diverses pathologies auto-immunes ou de provoquer l'apparition de tumeur. Le nombre total de souris utilisées sur 5 ans sera de 1708, ce nombre est réduit au maximum afin d'être toutefois suffisant pour assurer la reproductibilité de l'expérience et appliquer des tests statistiques entre les différentes conditions.

Ces souris seront soumises à des régimes alimentaires riches, ou carencés, en fer avant induction de différentes pathologies inflammatoires, telles qu'une maladie inflammatoire de l'intestin, une encéphalomyélite auto-immune expérimentale, une inflammation systémique, ou une

transplantation de cellules tumorales. Afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligée aux animaux, toutes ces procédures seront réalisées sous anesthésie générale et des antalgiques seront systématiquement administrés. Les animaux seront particulièrement surveillés et des points-limites précis ont été établis, entraînant l'euthanasie anticipée de l'animal si nécessaire. [SEP]

En parallèle, nous étudierons les effets d'une accumulation de fer endogène, génétiquement induite dans le foie ou dans les intestins de souris, et ses conséquences sur le système immunologique.

Ces études permettront à terme de déterminer précisément comment le taux de fer présent dans l'organisme peut orienter certaines réponses immunitaires (tolérance vs réponse pro-inflammatoire) et pourraient permettre de définir le fer comme une nouvelle cible thérapeutique et ainsi d'ouvrir la voie à de nouvelles stratégies et techniques immunologiques.

10084 Les cancers sont caractérisés par une prolifération incontrôlée de cellules tumorales. Les globules blancs jouent un rôle majeur dans le contrôle de cette prolifération. Les lentivirus sont particulièrement intéressants pour une approche vaccinale thérapeutique dans le domaine de l'oncologie car ils permettent d'activer ces globules blancs.

L'objectif de ce projet est d'évaluer l'effet de vaccins thérapeutiques dans le but de stimuler et orienter la réponse immunitaire et d'éliminer les cellules tumorales. En effet, l'existence de protéines spécifiques présentes uniquement dans les cellules tumorales permet de cibler les tumeurs. La vaccination avec des lentivirus permettrait ainsi d'induire des cellules spécifiques de ces protéines de tumeurs et capables de tuer les cellules tumorales. La tumeur pourrait ainsi être éliminée par les cellules induites par la vaccination.

Le bénéfice attendu de ce projet est le développement de vaccins thérapeutiques en oncologie humaine et plus particulièrement dans les cas de cancers induits par le papillomavirus, le cancer de la prostate, le cancer de la vessie et le cancer du côlon. Avant d'envisager leur utilisation chez l'homme, nous devons d'abord établir la faisabilité de cette technique dans un organisme vivant en caractérisant les réponses immunitaires et anti-tumorales induites par la vaccination. Ces réponses doivent être évaluées dans un organisme vivant du fait de la complexité des phénomènes impliqués. Les expériences de ce projet consistent à implanter une tumeur solide dans une série d'animaux, pour cela, des cellules tumorales seront injectées par voie sous-cutanée puis se multiplieront pour former une tumeur solide en quelques jours. Une partie de ces animaux sera traitée avec les lentivirus porteurs de l'antigène vaccinal, une seconde partie avec un lentivirus contrôle (un vaccin sans les gènes tumoraux) alors qu'une troisième série reste non traitée. La croissance tumorale est alors suivie par des mesures régulières de la taille de la tumeur. Pour évaluer l'activation du système immunitaire, les animaux seront euthanasiés à différents temps après l'implantation tumorale et la vaccination et les organes (rate, ganglions et tumeur) seront prélevés et analysés. Plusieurs conditions seront testées dans ce projet pour optimiser le protocole de vaccination comme l'utilisation d'un adjuvant ou encore la combinaison avec des inhibiteurs de point de contrôles, qui permettent d'augmenter les réponses immunitaires. La dernière étape de ce projet sera de tester le traitement optimisé sur des tumeurs de grosse taille, réputées pour être plus résistantes aux traitements. Il est d'une grande importance de développer des traitements efficaces dans ces phases tardives des cancers.

Dans le respect de la règle des 3R, les conditions à tester lors des expériences seront déterminées par des expériences réalisées *in vitro* (Remplacer), le nombre d'animaux utilisé sera réduit tout en conservant un minimum permettant d'obtenir des résultats significatifs (Réduire). Le nombre d'animaux à utiliser sera déterminé avec l'aide d'un biostatisticien et des tests statistiques de type ANOVA seront réalisés pour déterminer la significativité de nos résultats. De plus, la grille d'évaluation de la douleur nous permet d'établir des points limites qui entraîneront l'euthanasie de la souris dès l'apparition de critères définis (Raffiner) (prostration, faiblesse pour se déplacer ou masse tumorale >1500mm³ par exemple).

Ce projet comporte 4 procédures modérées pour un total de maximum 2300 souris femelles (lors des études cancer induits par le papillomavirus, cancer de la vessie ou cancer du côlon) ou des souris mâles (cancer de la prostate).

- 10085** La délivrance spécifique de principes actifs au niveau cellulaire, dans un organe ou un tissu biologique défini représente un défi majeur pour le traitement de nombreuses pathologies, en particulier les cancers tels que le cancer du poumon. Les molécules actives doivent être en mesure de franchir les barrières qui séparent le site d'administration des sites d'action désirés. La conception des nanosystèmes capables de transporter les principes actifs pour en améliorer la distribution et en limiter les effets secondaires, est un progrès important dans la vectorisation d'anticancéreux. Depuis, quelques années, l'innovation en recherche pharmaceutique se focalise sur la conception de systèmes théranostiques, systèmes qui combinent deux fonctions, une fonction diagnostique et une fonction thérapeutique, grâce à l'incorporation simultanée dans les vecteurs d'un principe actif anti-cancéreux et d'un agent de contraste d'imagerie. Le projet faisant l'objet de cette demande d'autorisation est donc dédié à l'évaluation chez le rongeur de ces nano plateformes théranostiques dans un contexte de tumeur pulmonaire. Un maximum de 572 souris pourra être inclus dans ce projet pour répondre aux problématiques explorées. Des points limites liés au comportement de l'animal (état général et masse de l'animal) et à la taille de la tumeur ont été fixés et les animaux les atteignant seront euthanasiés. Ce projet s'inscrit dans une démarche éthique appliquée à l'expérimentation animale en respectant la "règle des 3R". Lors de la phase d'inoculation de cellules tumorales, et afin de réduire la douleur induite pas le geste, les animaux recevront, 24h avant l'injection, de l'ibuprofène, médication maintenue pendant 72h. Tout au long du protocole, une attention particulière étant portée au maintien en normothermie des animaux à chaque phase d'exploration, par l'utilisation de tapis chauffants, y compris lors de l'examen en Imagerie par Résonance Magnétique. Le recours systématique à cette technique non invasive permet d'obtenir, pour chaque individu, des données longitudinales et donc de raffiner l'étude menée tout en réduisant le nombre d'animaux nécessaires pour répondre à la question scientifique posée.
- 10086** Parmi les tissus des vertébrés, le muscle squelettique est l'un des plus remarquables : il présente un développement et une croissance prodigieuse et possède de grandes capacités régénératrices. Ces capacités de croissance et de régénération font de lui un organe très plastique. À l'origine de cette plasticité musculaire se trouve un réservoir de cellules souches, dont les plus étudiées à ce jour sont les cellules satellites qui, comme leur nom l'indique, se localisent en périphérie des fibres musculaires. Ces cellules satellites ont une activité qui dépend de leur environnement et des interactions qu'elles entretiennent avec les autres types cellulaires contenus dans un muscle et nécessaire pour que la régénération soit efficace. L'objectif de notre étude porte sur la caractérisation des différents types cellulaires d'un muscle au cours du processus de régénération par la cytométrie de masse. Nos résultats préliminaires avec cette technique ont déjà permis d'identifier une voie de signalisation dans les macrophages et notamment une kinase dont on voudrait examiner plus précisément le rôle. Dans un but de suivre le principe des 3R et de réduire et remplacer l'utilisation excessive d'animaux impliqués dans le projet nous avons commencé à faire des cultures des macrophages in vitro pour obtenir des résultats préliminaires. Notre étude fera appel à un total de 702 souris au total réparties sur 4 procédures expérimentales. Pour raffiner, on réduit la souffrance des souris en utilisant des sédatifs et analgésiques au cours des procédures. Nous tentons également d'améliorer la qualité de l'élevage en enrichissant les cages expérimentales et celles dédiées à la reproduction.
- 10087** Les troubles de l'humeur, parmi lesquels la dépression et les troubles bipolaires, sont des maladies psychiatriques hétérogènes affectant environ 15 % et 2 % de la population mondiale, respectivement. Malgré le grave problème de santé publique que représentent ces troubles (l'OMS prédit qu'ils deviendront la cause majeure de morbidité à travers le monde à l'horizon 2030), les traitements existants ont une efficacité limitée et 60-70 % des patients sont partiellement ou non-répondeurs. Il est nécessaire de mieux comprendre la physiopathologie pour proposer de nouveaux outils diagnostiques et pouvoir développer des thérapeutiques plus spécifiques. Outre les états émotionnels altérés (grossièrement euphorique dans la manie et triste dans la dépression), les patients rapportent des modifications sensorielles, comme une perception plus

aiguë des odeurs, des sons ou des couleurs dans la manie. Cependant, ces symptômes sont peu pris en compte dans les critères diagnostiques définissant les troubles de l'humeur.

Au niveau cérébral, l'amygdale a récemment été décrite comme une région centrale dans l'attribution des valences positive et négative aux perceptions sensorielles, permettant de guider les comportements adaptés. En particulier, certains neurones spécifiques de l'amygdale coderaient pour le « positif », tandis que d'autres coderaient le « négatif ». Par ailleurs, il est connu de longue date que l'activité amygdalienne est altérée dans les troubles de l'humeur.

Les objectifs du projet sont d'étudier l'existence de biais perceptifs dans les troubles de l'humeur, à travers l'étude de la valence olfactive chez la souris, et de déterminer l'implication de l'amygdale et des autres structures du réseau cortico-limbique régulateur des émotions, dans ces biais perceptifs. Les bénéfices attendus sont une meilleure compréhension de la physiopathologie des troubles de l'humeur et l'évaluation de l'olfaction comme un potentiel outil diagnostique voire une cible thérapeutique dans ces troubles.

Pour mener à bien cette étude, nous allons utiliser deux modèles pharmacologiques mimant la dépression et la manie chez la souris, basés sur l'administration de corticostérone pour la dépression, et d'un composé inhibant la recapture de dopamine dans la manie. Nous étudierons ainsi l'effet de cette perturbation émotionnelle sur la valence olfactive et le système cortico-limbique, en particulier les neurones amygdaliens impliqués dans le codage « positif » et « négatif » des perceptions. Nous pourrions ensuite activer ou inhiber très spécifiquement ces neurones chez l'animal éveillé et libre de ses mouvements grâce à des techniques récentes par manipulation optogénétique et pharmacogénétique, et observer l'impact sur la valence olfactive et les états émotionnels.

Malheureusement, à l'heure actuelle, il n'existe pas de méthode alternative à l'expérimentation animale pour tester les perceptions et les altérations émotionnelles. La réalisation de ce projet nécessitera l'utilisation de 1066 souris mâles adultes. Ce nombre est le minimum requis pour la réalisation des études statistiques ultérieures, qui permettront une évaluation pertinente de l'effet des différentes conditions expérimentales sur le comportement et les réseaux neuronaux. Les 3 procédures utilisées ont un degré de gravité modéré. Ce projet occasionnera quelques effets néfastes pour les animaux. Les procédures chirurgicales seront réalisées de manière à minimiser la douleur et le stress des animaux, avec une anesthésie générale et des antalgiques systémiques et locaux durant la chirurgie, ainsi qu'un suivi post-chirurgical et l'administration d'antalgiques quotidiennement durant cinq jours après la chirurgie. Une fois que les souris seront bien remises de la chirurgie, nous allons créer des altérations émotionnelles chez les souris. Nous mesurerons leur comportement en utilisant différentes méthodes, principalement des tests pour évaluer l'état émotionnel (anxiété, dépression, hédonisme, exploration) et l'olfaction (valence olfactive).

10088 Un modèle animal permet d'étudier dans des conditions contrôlées de laboratoire les causes, les processus et les traitements éventuels d'une pathologie. Il doit présenter des similitudes avec la pathologie humaine correspondante en termes de symptômes et de mécanismes physiopathologiques. Ces modèles animaux de pathologies sont obtenus par des méthodes physiques, chimiques et pharmacologiques ou par sélection de lignées spécifiques. De nombreux modèles génétiquement modifiés ont également été obtenus par ajout ou retrait de gènes (souris knock-in ou knock-out). Une grande partie des connaissances en biochimie, physiologie ou pharmacologie ont été acquises grâce à l'étude des modèles animaux.

Dans ce contexte, l'imagerie et la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) sont des techniques d'investigation non irradiantes, non invasives, n'entraînant pas de douleur ou de souffrance chez l'animal anesthésié. L'application de ces méthodes in vivo chez le petit animal permet la caractérisation et la compréhension de modèles de pathologies, tant d'un point de vue anatomique que fonctionnel. Elle permet également la validation préclinique de nouvelles molécules à visée thérapeutique et l'étude des mécanismes d'action de médicaments actuellement utilisés.

Le premier avantage de l'imagerie RMN in vivo est la possibilité de suivre des phénomènes biologiques complexes chez un animal au décours de sa pathologie et donc d'utiliser moins d'animaux que lors d'approches in vitro ou in vivo invasives.

Le second avantage de l'imagerie RMN in vivo tient au fait que les technologies utilisées (aimants RMN, produits de contraste) sont identiques à celles utilisées chez l'Homme, permettant ainsi une recherche biomédicale translationnelle.

Or la mise au point de cette approche nécessite régulièrement de nouvelles séquences d'acquisition et méthodologies qui doivent être développées, évaluées et optimisées sur des animaux avant d'être applicables dans des projets de recherche.

Objectifs

Ainsi les objectifs principaux du projet mené sur des rongeurs sont :

- d'optimiser les paramètres d'acquisition de séquences existantes afin de les adapter au mieux au modèle biologique et à ses spécificités ;
- de développer et mettre au point de nouvelles techniques d'imagerie et de spectroscopie RMN.

Pour mener à bien ces objectifs, les développements et optimisations des méthodes RMN sur 5 ans seront réalisés sur 90 rats et 50 souris. Le caractère non-invasif de la méthode chez l'animal anesthésié permet des examens répétés chez un même animal, ce qui entraîne une réduction du nombre d'animaux utilisés pour ces développements méthodologiques. Les conditions d'hébergement (plusieurs animaux par cage, stimulation régulière par un expérimentateur), le recours à l'anesthésie pendant les acquisitions et la définition au préalable de points limites permettent de réduire l'inconfort, la douleur, la détresse ou l'angoisse subis par les animaux.

10089 La lutte contre les dommages cérébraux constitue un véritable enjeu de santé publique (accidents vasculaires cérébraux, traumatismes cérébraux, lésions cérébrales, maladies neurodégénératives, etc.). Les séquelles liées à ces pathologies sont nombreuses et peuvent impacter plusieurs fonctions cérébrales telles que la cognition, la parole, la motricité ou encore les capacités mnésiques.

Malheureusement, les traitements pour ces différentes pathologies cérébrales (ex : accidents vasculaires cérébraux et lésions cérébrales) sont pour le moment manquants ou peu efficaces. Ainsi, les conséquences de ce type de lésions cérébrales peuvent être la mort du patient ou le développement de séquelles permanentes (paralysie, aphasie, perte de sensibilité nerveuse, etc.). Afin de mieux comprendre les mécanismes inflammatoires, oxydants et les réseaux de gènes impliqués lors d'une atteinte cérébrale, nous nous proposons d'évaluer l'effet d'une lésion cérébrale chez le poisson zèbre au niveau de l'expression de gènes et au niveau histologique afin d'identifier des voies de signalisations clés dans la réparation cérébrale qui nous permettraient de développer des thérapeutiques favorisant la plasticité cérébrale.

Ces expérimentations seront menées sur un nombre total maximum de 600 poissons zèbre. Les poissons seront lésés au niveau du cerveau et euthanasiés à différents temps afin d'étudier la cinétique de la réparation cérébrale en lien avec les paramètres précédemment mentionnés :

- 60 (3 x 20) animaux maximum 1h après lésion.
- 60 (3 x 20) animaux maximum 3h après lésion.
- 60 (3 x 20) animaux maximum 6h après lésion.
- 60 (3 x 20) animaux maximum 12h après lésion.
- 60 (3 x 20) animaux maximum 24h après lésion.
- 60 (3 x 20) animaux maximum 48h après lésion.
- 60 (3 x 20) animaux maximum 72h après lésion.
- 60 (3 x 20) animaux maximum 5j après lésion.
- 60 (3 x 20) animaux maximum 7j après lésion.
- 60 (3 x 20) animaux maximum 14j après lésion.

De par des mécanismes physiologiques fortement conservés au cours de l'évolution, le poisson zèbre présente l'avantage d'être un modèle simplifié pour la modélisation de maladies humaines, ainsi que pour la découverte et le développement de composés pharmaceutiques. Aujourd'hui, le poisson zèbre est reconnu pour sa pertinence dans l'étude d'un certain nombre de mécanismes physiologiques transposables à l'Homme. C'est notamment un excellent modèle d'étude de la réparation cérébrale.

Cette étude qui répond à la règle des 3R :

Remplacement : Il semble indispensable de passer au modèle animal pour mieux comprendre les mécanismes de réparation cérébrale qui doivent tenir compte de la complexité cellulaire et tissulaire du cerveau. Le poisson zèbre présente plus de 70% de gènes en commun avec l'homme ; 85% de gènes impliqués dans des pathologies étant communs entre l'Homme et le Poisson. C'est un modèle relevant utilisé par la communauté scientifique pour la compréhension de divers processus physiologiques et pathologiques.

Réduction : Les expérimentations ont été conçues afin d'utiliser le moins d'animaux possible, tout en permettant de réaliser des études statistiques (student t-test et ANOVA). Si les résultats obtenus au cours des expérimentations permettent de réduire le nombre d'animaux, le nombre total de 600 animaux ne sera pas atteint. Il est toutefois nécessaire d'avoir une grande quantité d'animaux pour pouvoir extraire le matériel génétique de la zone lésée qui est très restreinte.

Raffinement : Les poissons seront placés dans des conditions optimales (cycle jour/nuit : 14h/10h ; température : 28.5°C ; oxygénation). Les animaux seront nourris plusieurs fois par jour, et toute manipulation invasive sera précédée d'une anesthésie générale.

10090 Les cellules souches du sang, appelées cellules souches hématopoïétiques, assurent tout au long de la vie la production de toutes les cellules circulant dans le sang et permettant le transport de l'oxygène (les globules rouges), la cicatrisation (les plaquettes sanguines), la lutte contre les infections (les globules blancs). Ces cellules souches sont également particulièrement importantes en thérapie cellulaire qui est un moyen biotechnologique très important utilisé entre autres dans le traitement de nombreuses pathologies hématologiques telles que certains cancers du sang (leucémies). La thérapie cellulaire consiste en une greffe de cellules souches saines du sang (le greffon) qui en se développant chez le receveur reconstitue la moelle osseuse, puis le sang normal. Notre Laboratoire a pour mission le développement et la conservation de ces greffons humains à partir de cellules issues des différentes sources que sont la moelle osseuse, le sang placentaire et le sang périphérique. Cela requiert des études de fonctionnalité des cellules qui composent ces greffons et notamment des cellules souches responsables du succès de la greffe. Dans une étude préliminaire, nous avons montré *in vitro*, le rôle bénéfique de la Vitamine E pour préserver les cellules souches humaines au cours des phases de préparation des greffons (phases d'amplification et de conservation). Nos résultats préliminaires suggèrent que la Vitamine E pourrait être un élément régulateur essentiel du maintien des cellules souches *in vivo* en contrôlant leur prolifération. Ces résultats soulèvent la question du rôle de la Vitamine E en situation réelle, c'est-à-dire *in vivo*, sur le devenir des cellules souches au sein de la moelle osseuse, ainsi que sur leur capacité à produire toutes les cellules sanguines. Pour répondre à cette question nous souhaitons mettre en place un modèle de souris recevant une alimentation carencée en Vitamine E pour étudier l'impact de cette carence sur leurs cellules souches. Ces souris devront être euthanasiées afin de réaliser des analyses *in vitro* et *in vivo* (tests de greffe requis pour évaluer les cellules souches) à partir des cellules de leur moelle osseuse et de leur sang. Ces analyses sont indispensables pour mesurer l'impact de la vitamine E sur les cellules souches et sur les cellules plus matures. Le Remplacement des animaux par des systèmes *in vitro* est impossible car aucune étude *in vitro* ne peut reproduire la complexité d'un organisme et notamment la complexité de la niche hématopoïétique des cellules souches et ne peut donc prédire si les effets observés *in vitro* seront augmentés, atténués ou compensés *in vivo*. Nous avons recherché dans la littérature scientifique des données sur les effets d'une carence en Vitamine E dans des modèles animaux, et bien que des travaux existent, aucun n'a étudié l'impact sur les cellules souches. L'étape *in vitro* préliminaire a permis de réduire le nombre d'animaux nécessaires à 80 souris ce qui permettra de réaliser des tests statistiques suffisamment robustes. Nous limiterons également la durée de la carence en Vitamine E afin de ne pas engendrer d'inconfort chez les animaux. Les souris seront hébergées selon les règles en vigueur de raffinement et un soin particulier sera apporté afin d'assurer leur bien-être.

10091 Ce projet consiste à mettre en évidence le mode d'action d'une nouvelle approche de contrôle du développement de tumeur chez la souris. Pour cela, des souris de la lignée CB57Bl/6 seront

utilisées afin d'établir l'efficacité et le mode d'action de 2 composés sur le développement d'une tumeur.

Ce projet est découpé en 2 parties successives.

Dans un premier temps, l'efficacité du traitement ainsi que son mécanisme d'action seront étudiés.

Dans un second temps, plusieurs composés optimisés seront testés.

Cette expérimentation nécessitera au maximum l'utilisation de 384 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 des composés 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 nos expériences précédentes.

- 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). Les souris sont suivies quotidiennement et des points limites sont définis.

10092 Les techniques actuelles de remplacement de l'œsophage pour lésions bénignes ou cancéreuses consistent à utiliser l'estomac ou une partie du colon comme substitut. Ces techniques sont grevées d'une importante morbidité, conduisent à des résultats fonctionnels à long terme souvent imparfaits et nécessitent le remplacement de l'ensemble de l'œsophage même en cas de défaut de faible longueur. Enfin, l'échec par ces reconstructions conduit à une nutrition artificielle à vie. Les indications de remplacement œsophagien les plus courantes sont les atrésies néonatales (500-1000 naissances par an), le cancer de l'œsophage (4500 cas/an dont 20% nécessitent une chirurgie lourde) et les tentatives de suicide par ingestion de soude caustique (30 cas/an).

Des études réalisées chez l'homme et dans des modèles animaux ont montré que l'ingénierie tissulaire représentait une alternative crédible à ces techniques. Le principe de l'ingénierie tissulaire est d'isoler des cellules d'intérêt à partir de prélèvement tissulaire réalisée chez le patient, d'en accroître le nombre *in vitro* jusqu'à atteindre la quantité nécessaire, puis de les déposer sur une matrice acellulaire. Le substitut ainsi créé (matrice + cellules) est réimplanté chez le patient, il est alors considéré comme une autogreffe. Cette approche a déjà été utilisée avec succès en clinique dans le remplacement de la vessie, des muscles et ligaments ainsi que de la trachée.

Les cellules d'intérêt seront les Cellules Souches Mésoenchymateuses (CSM) qui possèdent des propriétés immuno-modulatrice et anti-inflammatoire, et constituent donc un outil thérapeutique prometteur dans ce domaine. Elles ont déjà été utilisées avec succès dans des modèles animaux évaluant la régénération médullaire, vésicale, myocardique et osseuse mais leur intérêt pour la régénération œsophagienne après remplacement circonférentiel reste à démontrer.

La matrice sera obtenue à partir d'un œsophage de porc qui sera décellularisé par un procédé chimique, permettant d'obtenir une matrice extra cellulaire œsophagienne qui ne sera pas rejetée par le sujet receveur.

L'objectif principal de cette étude est d'évaluer le succès du remplacement circonférentiel de l'œsophage thoracique par une matrice d'œsophage décellularisée etensemencée de CSM autologues.

Le succès est défini par la survie, sans apport nutritionnel autre qu'une alimentation orale, après ablation de l'endoprothèse à 3 mois.

L'objectif secondaire est de déterminer si l'adjonction de CSM contribue à la régénération tissulaire vers un phénotype œsophagien et d'en évaluer la cinétique.

Seule l'expérimentation *in vivo* permet de répondre à la question posée. Le porc est un excellent modèle, fréquemment utilisé dans cette indication, du fait d'une anatomie et une physiologie proche de celle de l'homme. Certains paramètres expérimentaux, tels que le nombre de cellules à ensemencher et leurs durées de culture, ont auparavant été mis au point *in vitro*. Les techniques opératoires ont déjà été évaluées lors d'expérimentations précédentes et lors de travaux de dissections, permettant de réduire le nombre d'animaux utilisés.

Deux groupes seront constitués, le premier recevra un substitut œsophagien composé de matrice acellulaire ensemencé des cellules d'intérêt (CSM), le second recevra uniquement la matrice acellulaire.

Les résultats de ce projet permettront de comprendre si les CSM jouent un rôle bénéfique pour la régénération œsophagienne. A terme, le remplacement œsophagien par de tels substituts pourrait permettre, tout en préservant les organes intra abdominaux, de régénérer in vivo un néo-œsophage fonctionnel, de longueur adaptée à la pathologie traitée.

Cette étude, prévue sur 3 ans, nécessitera au maximum 25 animaux. Une analyse statistique a été utilisée afin d'estimer le nombre minimum d'animaux nécessaires à l'obtention de résultats significatifs.

Chaque étape de l'expérimentation sera réalisée sous anesthésie générale. Afin de réduire au maximum la souffrance de l'animal, des antalgiques seront systématiquement administrés 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. Par ailleurs, des points limites suffisamment prédictifs et précoces, motivant l'euthanasie anticipée de l'animal, ont été définis.

Afin de tenir compte des besoins quotidiens de nos animaux et d'améliorer leur bien-être, leur environnement sera enrichi (activité de foussement encouragée, médecine ball, jeux dans le couloir, planche à gratter, distributeur d'aliment actif.).

10093 La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est une pathologie neurodégénérative affectant les neurones moteurs du cerveau et de la moelle épinière. Bien que de nombreuses molécules soient actuellement en développement, aucune ne permet d'enrayer cette pathologie. Additionné aux nombreux effets secondaires, le traitement de référence possède une efficacité limitée.

Nous avons récemment identifié in vitro deux molécules ayant une efficacité dans le traitement de la SLA en comparaison du produit de référence. Ainsi, l'objectif de cette étude est d'identifier les molécules et d'évaluer leur réponse pharmacologique au travers de deux modèles murins complémentaires.

L'objectif scientifique de ce projet nécessite l'utilisation d'un modèle génétique souris de la maladie, ainsi qu'un modèle dont les symptômes seront induits pharmacologiquement. L'évaluation de la survie et des effets thérapeutiques serait impossible par le biais de cultures cellulaires.

Le modèle pharmacologique souris nous permettra de comprendre les mécanismes d'action mis en jeu et le modèle de souris transgénique SOD1 nous permettra de nous rapprocher au maximum du modèle pathologique de la SLA et constitue un modèle mammifère de choix.

Pour ce projet, nous utiliserons au maximum 558 souris mâles pour une durée maximale de 5 ans. Nous organiserons les expérimentations en vue d'affiner au maximum, la sélection des molécules et de limiter l'utilisation des modèles transgéniques.

Ce projet met en jeu l'administration de substances pharmacologiques, l'utilisation de modèles pharmacologique et génétique de la pathologie et une évaluation motrice 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 une supériorité d'efficacité des traitements en comparaison du produit de référence seul. Ainsi, caractériser la réponse pharmacologique des produits et en évaluer les effets sur les bénéfiques moteurs et la survie du modèle transgénique phare de la pathologie constitue un élément majeur permettant le développement de médicaments améliorant l'efficacité et la sécurité de certains traitements.

10094 Les objectifs scientifiques du présent projet visent à établir les mécanismes fondamentaux à la base des relations entre la mère et l'embryon au début de la gestation. La compréhension de ces éléments de la biologie de la reproduction est nécessaire dans le contexte de la baisse de fertilité enregistrée depuis 20 ans au sein des élevages bovins laitiers. Ceci a eu pour conséquence la pérennisation de pratiques d'élevage qui ne s'inscrivent pas dans la durabilité. La réforme anticipée d'un nombre croissant d'animaux pour infertilité en est un des principaux exemples. L'établissement et le déroulement de la gestation chez les mammifères reposent sur une série d'interactions

complexes entre l'organisme maternel et les gamètes, l'embryon puis le fœtus. Ces processus s'appuient sur l'enchaînement de mécanismes développementaux mettant en jeu l'expression de nombreux gènes porteurs de multiples régulations entre l'organisme maternel et l'embryon. Elles constituent les bases du « dialogue mère-embryon ». Les recherches menées jusqu'à ce jour ont contribué à identifier les bases moléculaires de ces interactions à différents stades de développement de la gestation chez les ruminants. L'objectif de ce projet est d'étendre le recensement des facteurs de l'environnement de l'ovocyte, de l'embryon et de comprendre les régulations qu'ils mettent en œuvre. Ces études sont essentielles car les connaissances actuelles montrent qu'une part importante de la mortalité embryonnaire a pour origine un défaut des mécanismes liés à ces interactions mère-embryon au moment de la différenciation de l'embryon. Les conditions d'élevage et en particulier le type de conduites alimentaires influencent très directement les éléments du microenvironnement de l'embryon et par voie de conséquence impactent la survie embryonnaire. Aujourd'hui et dans l'avenir, on peut s'attendre à ce que l'évolution des conduites d'élevage du fait d'objectifs économiques ou de considérations environnementales auront un impact sur la fertilité qu'il est important d'essayer de comprendre pour anticiper, voire de prévenir des évolutions non souhaitables. Ces arguments plaident en faveur d'un approfondissement des programmes scientifiques cherchant à connaître la nature des relations entre la mère et l'embryon au début de la gestation. La partie principale du présent projet envisage de collecter plusieurs séries d'échantillons biologiques chez l'animal vigile de l'espèce bovine à plusieurs stades de sa période reproductive. Près de trois cents animaux seront recrutés. Les prélèvements d'ovocytes et d'embryon s'effectueront selon des méthodes utilisées en routine dans les élevages. Des prélèvements de biopsies utérines seront également effectués. Enfin des prélèvements de sang sont effectués pour évaluer les concentrations des principaux facteurs métaboliques et hormonaux. La seconde partie du projet prévoit le prélèvement de tissus maternels (utérus, ovaire), embryonnaires et fœtaux à des stades plus avancées de la gestation. Dans ce cas, une cinquantaine d'animaux seront choisis parmi les vaches en fin de carrière. Synchronisées et inséminées de manière identique à ce qui est effectué dans la première partie du projet, elles seront euthanasiées dans les abattoirs commerciaux ou expérimentaux où les tissus seront récoltés. La règle des 3 R est respectée comme suit :

a) remplacer

La perspective scientifique de ce projet est de modéliser les régulations entre l'organisme maternel et l'embryon bovin au cours des premières semaines de son développement. Nous avons pour ambition le remplacement des études actuelles qui sont toujours effectuées in vivo par le développement de modèles cellulaires et d'organoides endométriaux.

b) réduire

Le choix des méthodes et des protocoles mis en œuvre vise à réduire le nombre d'animaux. A titre d'exemple, la super ovulation est choisie pour obtenir un nombre important d'embryons et limiter ainsi le nombre d'individus nécessaires. Egalement, l'augmentation des sensibilités de méthodes d'analyse permettent de réduire la quantité de matériel biologique que nous prélevons et a pour conséquence de réduire le nombre d'animaux nécessaires.

c) raffiner

La pression expérimentale sur les animaux de ce projet est réduite car les procédures utilisées sont celles utilisées dans l'élevage bovin. Toutes les procédures ont été choisies pour préserver la santé et le bien-être de l'animal. Les méthodes que nous avons choisies sont non invasives, préservent l'intégrité et la fonctionnalité de la sphère génitale ce qui permet, en fin d'expérimentation le retour des animaux dans l'élevage. Deux procédures distinctes maximales seront appliquées à un même animal. Elles pourront être répétées trois fois au cours de sa vie expérimentale.

10095 De nos travaux antérieurs, l'effet bénéfique de l'association de 5 extraits de plantes sur le métabolisme de souris diabétiques (modèle db/db) 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. Pour l'obtention de cet extrait, nous avons mis au point différentes méthodes d'extraction et de purification pour déterminer un effet optimal des molécules actives contenues dans celui-ci.

L'objectif de cette étude est de tester ces différents extraits obtenus de procédés différents sur le métabolisme de souris diabétiques, en comparaison avec notre extrait initial et des produits de référence décrits dans la littérature :

- Une partie des souris recevra un régime standard, afin de cibler l'effet de nos produits sur l'état diabétique de l'animal et donc l'intérêt majeur sur le métabolisme glucidique.

- Une partie des souris recevra un régime méthionine choline déficient, afin de cibler l'effet de nos produits sur le développement de la stéatohépatite non alcoolique (NASH) et donc l'intérêt majeur sur l'aggravation du diabète en présence d'une inflammation hépatique.

En effet, ces atteintes hépatiques regroupés sous le terme NAFLD/ NASH (non alcoholic fatty liver disease and non alcoholic steatohepatitis) ayant une prévalence et en nette augmentation à travers le monde, sont reconnues comme étant élevant le risque de développer un diabète de type 2 et des maladies cardiovasculaires. Si aucun traitement n'est apporté contre leur développement, environ 30 % des personnes atteintes auront une issue fatale où la seule alternative devient la transplantation hépatique.

L'étude sera réalisée selon la règle des 3 R (remplacer, réduire, raffiner) :

- Le recours à un modèle in vitro n'est pas souhaitable car les modèles cellulaires de mimétisme du diabète de type 2 et de la NASH 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. Il est également un bon modèle pour la NASH en présence d'un régime méthionine/choline déficient, car l'état pathologique et inflammatoire est proche de la pathologie humaine.

- L'étude se compose de souris diabétiques âgées de 6 semaines. Les traitements seront incorporés dans la nourriture des animaux pour une durée de 8 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 14 animaux par groupe est ainsi nécessaire pour mettre en évidence un résultat statistiquement significatif.

- Les procédures réalisées sur les animaux (pesée, mesure de la glycémie et insulinémie à jeun) sont pour la plupart non-invasives et réalisées sans anesthésie car elles n'engendrent qu'un état de stress minimal. Afin de réduire la charge de stress sur les animaux, ces mesures seront réalisées une seule fois par semaine. Le détail des points de contrôle est précisé. Une attention particulière sera prêtée au comportement des animaux par les expérimentateurs et la personne chargée du bien-être animal afin de surveiller une éventuelle dégradation de son état de santé, auquel cas ce dernier serait immédiatement sorti du protocole.

Un nombre maximal de 182 souris db/db seront utilisées pour cette étude.

10096 L'absence d'une protéine de la matrice extracellulaire, la substance entourant les cellules des tissus, est responsable d'un groupe hétérogène de maladies neuromusculaires. Nous avons reproduit dans la souris une mutation identifiée chez un patient présentant cette forme de myopathie. Les animaux homozygotes sont viables, fertiles, et ont une durée de vie normale. Ils développent une faiblesse progressive des muscles squelettiques. Ce modèle est donc adapté pour l'évaluation d'approches thérapeutiques et ne peut être remplacé puisque des systèmes cellulaires ne reproduisent pas la complexité tissulaire indispensable à l'évaluation des bénéfices fonctionnels. A l'heure actuelle, les seules pistes thérapeutiques étudiées visent à corriger les défauts secondaires et sont donc non-spécifiques. L'objectif de cet avenant à un projet déjà autorisé est de tester un nouveau vecteur pour une approche de thérapie génique afin de ré exprimer dans le tissu d'intérêt la protéine déficiente. En effet, nous nous sommes rendus compte que le vecteur initialement utilisé ne transduisait pas de façon suffisamment efficaces les cellules qui permettront la réexpression de la protéine ciblée. Nous ne pouvons réaliser ces tests dans un autre système que le modèle animal (principe de remplacement) car les mécanismes de transduction de cellules in vivo et in vitro peuvent différer et nous avons besoin de savoir si l'approche est suffisamment efficace à l'échelle d'un muscle entier afin de pouvoir espérer un bénéfice fonctionnel. Nous souhaitons donc réaliser une étude pilote dans notre modèle de souris sur un petit nombre d'animaux (deux portées soit environ une douzaine) qui nous permettra de conclure définitivement le projet précédemment autorisé, en ayant utilisé un nombre plus faible d'animaux que prévu (ce qui sera en accord avec le principe de réduction). Des injections intramusculaires sur souris nouveau-nés seront réalisées et

des analyses histologiques, immunohistochimiques et biochimiques réalisées 1 mois après injection permettront d'obtenir les réponses recherchées. Les conditions d'hébergement et la procédure seront réalisées dans les meilleures conditions (principe de raffinement) avec une surveillance journalière des animaux et un hébergement en zone adaptée au type de vecteur viral testé. Une grille de points limites sera établie et permettra de vérifier que la procédure n'a pas entraîné d'effets délétères notamment sur la locomotion des animaux, ni leur capacité à se nourrir.

10097 Les maladies génétiques représentent aujourd'hui un enjeu de recherche translationnelle mais demeurent encore difficiles à traiter. Parmi elles, la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) qui est une maladie orpheline, touche un garçon sur 3500 à la naissance, son pronostic étant systématiquement létale à 25 ans en moyenne.

Ce projet s'inscrit dans le cadre d'une preuve de concept préclinique visant à démontrer l'efficacité de nouvelles molécules têtes de série dans le rétablissement de la santé des muscles striés squelettiques lésés dans la DMD. Les têtes de séries auront été préalablement identifiées par criblage à haut débit dans un modèle in vitro et optimisées dans leur composition et leur formulation pour permettre l'administration in vivo. Les composés seront testés par injection ou per os dans un modèle murin MDX ainsi que sur des témoins sauvages correspondants. Les souris MDX ont l'avantage de récapituler une partie des symptômes de la pathologie DMD humaine, ce qui en fait un modèle de référence dans ce domaine. Elles expriment notamment une version tronquée de la dystrophine. Cette anomalie est retrouvée chez un tiers des patients DMD. En effet, ces derniers peuvent présenter plusieurs types de mutations dans le gène codant pour la dystrophine, une protéine musculaire majeure permettant l'ancrage de la machinerie moléculaire de la contraction dans la membrane des fibres. Toutes les mutations conduisent d'une manière plus ou moins sévère au raccourcissement de la protéine et à sa perte partielle ou totale de fonction. Cela génère lors de la contraction des muscles des lésions répétées conduisant à la destruction des muscles striés squelettiques progressivement remplacés par de la graisse et du tissu fibrosé.

Les avancées de ce plan de recherche préclinique permettraient de déboucher sur le développement de candidats-médicaments. Ils seront alors développés pour une utilisation en clinique en tant que traitement à cette pathologie rare de l'enfant et du jeune adulte.

L'étude utilisera 120 souris mâles âgées de 4 à 19 semaines. Elles seront réparties selon le besoin de l'étude en plusieurs groupes de 10 animaux. Dans tous les cas, tout sera mis en œuvre pour limiter au maximum ce nombre et mutualiser les groupes témoins MDX et sauvages.

Les composés seront administrés aux souris pendant 4 semaines. Tout signe de douleur ou de souffrance sera traité en fonction de la sévérité par administration d'analgésiques ou par euthanasie de l'animal.

A l'issue de la période de traitement, les souris subiront des tests physiques permettant de ségréger les souris présentant une amélioration des symptômes. En cas d'amélioration d'un des groupes, toutes les souris recevront jusqu'à deux cycles supplémentaires de traitements quotidiens afin d'augmenter l'effet bénéfique observé. A chacun de ces cycles, les animaux subiront les mêmes tests physiques.

A l'issue du dernier cycle, ou en cas d'absence d'effet bénéfique du traitement à la fin d'un des cycles précédents, tous les animaux seront soumis à une mesure in situ d'un des muscles des pattes postérieures. Puis leur sang sera prélevé avant euthanasie. Les muscles seront enfin prélevés pour des études histologiques.

Les expérimentations in vivo sont maîtrisées et n'entraînent pas d'effets secondaires.

1- Remplacement : Les effets biologiques recherchés ne permettent pas le remplacement du modèle animal par un quelconque modèle in silico ou in vitro. Effet, ici l'effet des molécules testées sont hautement tributaires de leur biodisponibilité, temps de demi-vie et activité dans un organisme complexe. De plus leur application finale est d'impacter directement la structure musculaire qui ne peut être observée que dans un mammifère vivant.

2- Réduction : Cette étude a été établie avec un minimum de souris afin d'obtenir un échantillonnage permettant d'obtenir une puissance statistiquement significative. L'estimation 120 souris au total se base sur le savoir-faire acquis par les expérimentateurs de notre structure en connaissant les risques de pertes liés aux manipulations.

3- Raffinement : L'espèce *Mus Musculus* a l'avantage de présenter de nombreuses souches mutantes, dont la lignée MDX afin de modéliser la pathologie DMD humaine. L'espérance de vie de cette lignée est plus courte d'environ 20% par rapport à une lignée sauvage. Cela s'explique par son vieillissement musculaire accéléré aboutissant à une mort prématurée par épuisement et asphyxie. Les traitements qui seront testés ici sont tous soupçonnés, à l'issue de tests *in vitro*, d'améliorer la survie et/ou la qualité de vie et/ou la santé musculaire des animaux traités. Concernant l'administration de composés, l'injection intra-péritonéale ou le gavage seront effectués par un expérimentateur averti afin de diminuer le stress lié au traitement répété dans le temps. Tout animal pouvant présenter des signes de mal-être sera méticuleusement suivi en appliquant, le cas échéant, des points limites mettant fin à toute souffrance.

10098 La recherche de l'autonomie protéique est un enjeu fort pour la filière porcine française. Un des enjeux de ce projet est de rechercher de nouvelles matières premières riches en protéines en valorisant une légumineuse fourragère : la luzerne. L'objectif de cet essai est mesurer les coefficients d'utilisation digestive apparente de la matière sèche, de la matière organique, de la matière azotée totale, des lipides et de l'énergie de matières premières issues de la luzerne chez le porc en croissance. Au total, 2 répétitions de 15 porcs seront utilisées dans cette étude. Les animaux seront logés dans des cages à digestibilité pendant 11 jours (4 jours d'adaptation + 7 jours de collecte des fèces et des urines) et recevront un des 6 régimes expérimentaux (R1, R2, R3, R4, R5 et R6). Dans les régimes R1 à R5, de la farine de feuilles de luzerne sera incorporée à respectivement 0, 5, 10, 15, 20%. Dans le régime R6, un ensilage de feuille de luzerne sera incorporé à 25%. La digestibilité de chaque biomasse sera obtenue en appliquant le principe de calcul par différence avec un régime témoin.

Le projet a été élaboré dans le respect de la règle des 3R.

Remplacement : Les mesures sur animaux sont requises car l'objectif de l'étude est de déterminer l'utilisation digestive de la matière sèche, de la matière organique, de la matière azotée totale, des lipides et de l'énergie et il n'est pas possible d'étudier l'utilisation digestive des nutriments autrement que sur un animal entier et vivant.

Réduction : le nombre d'animaux ($n=5/\text{régime}$) et le dispositif expérimental mis en place ont été déterminés sur la base d'essais antérieurs afin d'atteindre le niveau de précision souhaité pour l'intégration des résultats du projet dans des tables de composition nutritionnelle tout en limitant le nombre d'animaux et la durée d'hébergement dans des cages à digestibilité.

Raffinement : La collecte totale des excréta sur des animaux entravés est à l'heure actuelle la seule méthode permettant de mesurer la digestibilité fécale avec une grande précision. Les cages (dimensions : 77 x 125 cm) dans lesquelles seront hébergés les animaux seront équipées de barreaux et seront toutes placées dans la même pièce afin de maintenir un contact visuel, auditif et olfactif entre les porcs. L'appétit (pesée individuelle des refus alimentaires), l'ingestion d'eau, le comportement des animaux ainsi que l'état de la cage seront observés au moins deux fois par jour par le personnel des animaleries afin de détecter des blessures éventuelles, des diarrhées, des troubles respiratoires ou des troubles du transit digestif. Tout animal présentant l'un de ces troubles fera l'objet d'une prise en charge immédiate. Lors de l'euthanasie des animaux, une pré-anesthésie sera réalisée par injection intramusculaire de kétamine (Imalgène 1000® ; intramusculaire ; 15 mg/kg).

10099 La polyarthrite rhumatoïde (PR) et le psoriasis sont des maladies chroniques, inflammatoires. Ces pathologies entraînent douleurs et handicaps. L'arthrite psoriasique est une pathologie au cours de laquelle les patients accumulent inflammation de la peau et des articulations. Les causes de ces maladies sont inconnues ; certains facteurs génétiques, certains facteurs environnementaux (fumer augmente le risque de développer une PR) ou l'existence d'autres pathologies, sont autant de terrains favorables pour l'installation de ces maladies. La PR réduit non seulement la qualité de vie, mais également l'espérance de vie du fait de complications cardiovasculaires. Son coût est élevé pour la société. Le développement de ces maladies peut se diviser en trois phases : une phase d'initiation pendant laquelle les signes cliniques de la maladie sont invisibles, une phase chronique

pendant laquelle le mécanisme inflammatoire chronique s'installe, puis une phase aiguë ou chaque poussée se traduit par des destructions tissulaires.

Les traitements actuels ont une efficacité inconstante. Ils peuvent mettre en rémission une minorité de patients, ou être transitoirement efficaces, voir inefficaces d'emblée. L'une des cibles thérapeutiques principales dans la PR est le VEGF (« Vascular Endothelial Growth Factor »). En physiologie normale, cette cytokine intervient dans la construction et le maintien des vaisseaux sanguins. Dans la PR, on observe un épaissement de la membrane qui entoure les articulations, la membrane synoviale. Son épaissement, que l'on qualifie souvent de "pseudotumoral", se traduit par une mauvaise oxygénation du tissu. En réponse à ce stress, le tissu synovial se met à produire du VEGF afin de stimuler la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, poursuivant ainsi son épaissement. Chez les patients atteints de PR, on retrouve une quantité accrue de VEGF dans le liquide synovial et dans le sang périphérique. Ce taux est corrélé avec la sévérité de la maladie. Cependant, du fait de l'existence de nombreuses formes de VEGF se fixant sur plusieurs récepteurs différents, la place de cette cytokine reste mal comprise dans la PR et les maladies inflammatoires chroniques.

L'objectif de ce projet est de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques, directement ou indirectement liées à l'activité du VEGF et à d'autres cytokines inflammatoires, placées au centre de maladies chroniques inflammatoires comme la PR, le psoriasis et l'arthrite psoriasique. Nous cherchons à mieux comprendre les mécanismes d'initiation, de maintien et de poussée de la maladie tout au long de la vie d'un patient afin d'identifier les meilleures cibles. En particulier, l'implication du VEGF et ses interactions avec les autres cytokines inflammatoires (TNF-alpha et IFN-alpha) seront recherchés dans des modèles animaux d'inflammation tissulaire (articulaire ou cutanée). Nous évaluerons les conséquences de sa neutralisation sur l'inflammation.

Les mécanismes que nous souhaitons étudier demandent d'avoir un système immunitaire complet et proche de celui de l'homme. L'utilisation de la souris est donc tout indiquée dans cette étude, et se fera en accord avec la règle des 3R. Le nombre d'animaux utilisés dans les différentes procédures d'arthrite expérimentale et de psoriasis induit sera réduit au maximum afin de permettre des analyses statistiques solides. Ce projet de recherche nécessitera l'utilisation de 980 souris au maximum sur 3 ans. Des points limites destinés à limiter l'inconfort et la douleur des souris seront mis en place dans chaque expérience et tous les animaux seront pesés et leur comportement surveillé afin de veiller à leur bien-être.

10100 Les valeurs sanguines des ions doivent être maintenues à l'intérieur d'intervalles étroits, sous peine d'entraîner des désordres plus ou moins graves, parfois mortels. Le rôle principal du rein est de maintenir des valeurs dans des limites acceptables en contrôlant la quantité de chaque ion éliminé dans l'urine. Dans le cas particulier du calcium et du magnésium, le rein assure ce rôle en réabsorbant la quantité nécessaire de ces 2 cations.

Une maladie humaine, appelée hypomagnésémie familiale avec hypercalciurie et néphrocalcinose, est caractérisée par une perte massive de calcium et de magnésium, l'apparition de calcifications du rein (néphrocalcinose) et une insuffisance rénale progressive qui atteint souvent son stade terminal au cours de la troisième décennie et nécessite le recours à l'épuration extrarénale (dialyse) ou à la transplantation. Cette maladie est due à une anomalie des protéines claudine 16 ou claudine 19, situées dans la jonction serrée d'une partie spécifique du tubule rénal, appelée "branche ascendante large de l'anse de Henle". Normalement, la présence de ces protéines rend les jonctions serrées perméables au calcium et au magnésium, permettant leur réabsorption et évitant leur fuite dans l'urine. Les protéines mutantes ne sont pas capables de faire ce travail. Cette maladie est incurable, actuellement.

Un modèle animal a été créé il y a quelques années pour tenter de comprendre la physiopathologie de la maladie : dans ce modèle, le gène de la protéine Claudine 16 a été inactivé, générant des animaux dépourvus de la protéine claudine16 (Claudine16 Knock out) : ces animaux ont une hypomagnésémie et une hypercalciurie mais ils ne développent ni néphrocalcinose ni insuffisance rénale, empêchant d'étudier la physiopathologie de ces complications. Afin de pallier les insuffisances du modèle Claudine16 Knock out, nous avons créé un modèle dans lequel la protéine Claudine16 exprime la mutation pathogène la plus fréquemment rencontrée chez les humains

(L151F), où une leucine (L) est remplacée par une phénylalanine (F) ; le gène porteur de la mutation est dénommé Claudine16 mut dans la suite du document.

Les objectifs sont :

- d'identifier les anomalies sanguines et urinaires provoquées par la mutation L151F chez la souris
- de mesurer les conséquences de la mutation sur la capacité des segments tubulaires rénaux à réabsorber les ions ex vivo
- d'étudier l'évolution de la fonction rénale au cours de la vie des animaux
- d'étudier l'apparition et le développement de la néphrocalcinose.

La règle des 3R a été appliquée du mieux possible lors de l'élaboration du protocole d'étude.

Il n'y a pas d'alternative à cette étude, les modèles cellulaires existant ne permettant pas de rendre compte de la complexité du fonctionnement du tissu rénal intact (remplacement).

Les mesures réalisées tiennent compte de l'état de l'art de manière à avoir la meilleure performance des mesures réalisées et réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. Cent soixante animaux (60 wild type/wild type, 40 wild type/mut et 60 mut/mut) sont utilisés dans le projet. Le nombre d'animaux par groupe a été calculé en tenant compte de la variabilité des paramètres d'intérêt en fonction des conditions expérimentales (réduction).

Toutes les procédures le nécessitant seront réalisées sous anesthésie. Dans la mesure du possible, en fonction des contraintes des procédures, les animaux bénéficient d'un environnement enrichi et leur souffrance est prise en compte et atténuée au maximum (raffinement).

10101 L'objectif principal de ce projet est de mieux comprendre comment C4, un gène dont une plus forte expression prédispose à la schizophrénie, influence la maturation des neurones. La schizophrénie est une pathologie invalidante qui touche environ 1% de la population adulte et se caractérise notamment par des hallucinations et des idées délirantes, un retrait social, et des déficits cognitifs. Ces symptômes sont mal traités par les médicaments actuellement disponibles, et les effets secondaires de ces traitements sont importants. Il est donc essentiel de mieux comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires sous-jacents pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Des études génétiques récentes montrent que certaines variantes génétiques du complexe majeur d'histocompatibilité prédisposent à la schizophrénie. En particulier, la présence de variantes conduisant à une plus forte expression du gène du complément C4 est corrélée à une prévalence accrue de la maladie. Dans ce projet, nous étudierons comment la surexpression de C4 dans le cortex préfrontal de souris influe sur la maturation neuronale dans deux types de neurones différents : les cellules pyramidales d'une part, et les interneurons à parvalbumine d'autre part, dont la morphologie et/ou la fonction sont altérées dans le cerveau de patients schizophrènes. Le projet combine l'utilisation de souris transgéniques, d'une technique d'électroporation permettant la surexpression de C4 dans le cerveau avec de l'immunohistochimie, de l'analyse morphologique et des méthodes d'électrophysiologie.

La technique d'électroporation a l'avantage d'être rapide et de réduire le nombre de souris nécessaire par comparaison aux méthodes classiques de génération de lignées de souris mutantes. Des travaux précédents nous ont permis de valider les techniques et donc de minimiser le nombre d'animaux requis afin de comparer d'une manière statistique la condition mutante à la condition contrôle. Pour ce projet, nous utiliserons 106 femelles gestantes répartis entre souris "sauvages" (C57BL6) et souris transgéniques (PV-Cre : RCE).

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

Total des souris utilisées dans les procédures décrites : 106 souris gestantes et 424 embryons électroporés.

Notre projet suit la règle des « 3R » (remplacement, réduction, raffinement). Le remplacement de l'expérimentation animale n'est ici pas possible, car la complexité des mécanismes de la période critique n'est pas reproductible in vitro. L'utilisation de l'électroporation permettra de réduire le

nombre d'animaux utilisés, par rapport à la création de souris transgéniques. Enfin, nous utiliserons les protocoles d'analgésie, d'anesthésie et d'hébergement les plus poussés pour limiter au maximum l'inconfort des animaux.

10102 La pathologie ischémique cardiovasculaire est un enjeu de santé publique bien connu car représentant une des principales causes de décès des maladies cardiovasculaires. Un événement ischémique apparaît suite à l'obstruction d'une des artères qui irrigue le muscle cardiaque, entraînant la lésion des tissus et une modification de la fonction cardiaque. Un diagnostic précis de ce syndrome est indispensable car les patients hospitalisés en urgence puis libérés de façon inappropriés représentent un groupe à haut risque, avec un taux de complications fatales ou potentiellement mortelles allant jusqu'à 26 %. Il devient donc essentiel de détecter le plus précocement possible la survenue d'un événement ischémique afin d'en réduire sa morbi-mortalité. Actuellement, un diagnostic rétrospectif d'un syndrome coronarien aigu bref est guidé par la clinique, dont l'Electrocardiogramme, et la troponine mais ne sont pas suffisants. D'autres techniques diagnostiques sont donc nécessaires et l'imagerie moléculaire en fait partie. L'objectif de cette étude est de mettre au point une méthode de diagnostic précoce par imagerie isotopique pour la détection de périodes ischémiques cardiaques. Un polysaccharide radiomarqué est particulièrement étudié.

Le radiomarquage de ce polysaccharide est décliné sous plusieurs formes pour être adapté à l'imagerie TEP (Tomographie par Emission de Positron) et l'imagerie TEMP (Tomographie par Emission Mono-Photonique).

Pour chaque modalité d'imagerie, la mise au point du radiomarquage et l'évaluation de sa capacité de fixation à un site ayant subi une ischémie nécessite l'utilisation d'animaux sains ou ayant eu l'induction d'une ischémie cardiaque. Avant la première injection à l'homme d'un radiotraceur, il est requis de déterminer sa biodistribution et sa pertinence clinique (sensibilité, spécificité) chez l'animal, le recours aux modèles murins se faisant en première intention.

L'utilisation de systèmes d'imagerie in vivo dédiés au petit animal permet de réduire le nombre d'animaux nécessaires en comparaison des méthodes standard de comptage tissulaire avec euthanasie des animaux à chaque acquisition de données. En effet, avec l'imagerie, le même animal peut être suivi au cours du temps et peut être imagé à plusieurs reprises avec un résultat obtenu rapidement sans euthanasie de l'animal. Cela permet également de renforcer la pertinence scientifique, le même animal étant son propre témoin tout au long de l'étude.

Cette évaluation nécessite l'utilisation de 584 rats de type Wistars sur 5 ans.

Les mesures nécessaires seront prises pour limiter la douleur et le stress des animaux par l'utilisation d'anesthésiants et d'analgésiques au cours de l'induction du modèle d'ischémie cardiaque et de l'imagerie. Un suivi du bien-être des animaux sera fait au cours de ce projet par un contrôle régulier de l'état de santé des animaux avec recours aux analgésiques si nécessaire, notamment sur les animaux ayant eu l'induction du modèle d'ischémie cardiaque. L'acquisition des images in vivo n'étant pas douloureuse, l'animal est maintenu sous anesthésie gazeuse légère uniquement pour limiter ses mouvements et son stress. Les animaux seront euthanasiés en fin d'expérimentation.

Après la réalisation de ce projet et la validation sur animal de l'efficacité de détection précoce d'un événement ischémique par imagerie isotopique TEP et/ou TEMP, la preuve de concept se poursuivra chez l'homme au cours d'essais cliniques.

10103 Les patchs de couleur chez les animaux forment une catégorie majeure de signaux de communication qui reflètent fréquemment des traits de qualité individuels corrélés avec des facteurs génétiques et/ou avec la condition phénotypique. D'après la théorie, la fiabilité d'un signal de couleur peut être maintenue si un coût significatif est associé à sa production et/ou sa maintenance, par exemple expliqué par son lien avec la sécrétion d'hormones. L'objectif de ce projet est d'étudier les coûts potentiels liés à l'expression des signaux UV sur la gorge de lézards mâles du lézard vivipare (*Zootoca vivipara*) en relation avec la sécrétion de testostérone (T). Dans cette optique, nous procéderons à une expérience pilote afin de développer une méthode non-invasive de réduction et d'augmentation des taux plasmatiques de T chez des mâles adultes et sub-adultes issus d'une

population captive. La méthode non-invasive impliquera une application cutanée quotidienne de T ou de son inhibiteur dilués dans une huile. Il est impossible de remplacer le modèle biologique de cette étude par un équivalent cellulaire ou in silico. A l'aide d'un nombre réduit d'individus (n=50), nous chercherons à déterminer les concentrations exactes nécessaires pour que la manipulation induise des variations dans la gamme naturelle maximale trouvée dans des populations naturelles de cette espèce. Précisément, 25 mâles adultes et 25 mâles sub-adultes seront répartis en 3 groupes de traitements : 1) augmentation du taux de T (T+) selon 2 doses de T; 2) réduction du taux de T (T-) selon deux doses de l'inhibiteur; 3) contrôle. Les traitements seront appliqués avec différentes concentrations pendant 10 jours consécutifs et nous en déterminerons les conséquences sur le taux plasmatique de T, l'agressivité comportementale des mâles et leurs forces de morsure. Un échantillon minimum sera utilisé (5 individus par lot expérimental), les conditions d'élevage impliqueront un enrichissement des cages et des conditions climatiques estivales habituelles du milieu naturel.

10104 Avec plus de 8.8 millions de décès recensés en 2015 (OMS, 2017) le cancer représente aujourd'hui la seconde cause majeure de mortalité dans le monde. Malgré l'amélioration des méthodes de prévention et de traitement, la formation de métastases au cours de cette pathologie reste la première cause de mortalité chez les patients atteints de cancer. Les métastases se forment par un long processus faisant intervenir plusieurs étapes, notamment 1) l'invasion des cellules tumorales à travers le tissu d'origine 2) l'intravasation c'est-à-dire l'entrée de la cellule dans le sang à travers les vaisseaux sanguins 3) la dissémination dans la circulation sanguine 4) l'adhérence à la paroi des vaisseaux sanguins, 5) l'extravasation c'est-à-dire le passage de la voie sanguine vers le tissu secondaire et 6) la croissance de la métastase dans le site secondaire et particulièrement le poumon, le foie, la moelle osseuse et le cerveau.

La compréhension des phénomènes impliqués dans la dissémination métastatique est nécessaire pour trouver de nouvelles cibles et stratégies thérapeutiques, afin de prodiguer des traitements anticancéreux personnalisés et adéquats. Les modèles in vivo sont indispensables à la compréhension de ce phénomène particulièrement complexe. Le modèle de métastase spontanée qui repose sur l'inoculation des cellules tumorales au niveau de leur tissu d'origine (au niveau des glandes mammaires pour le cancer du sein et sous la peau pour les mélanomes), présente l'avantage de reproduire fidèlement les différentes étapes de la métastase.

Il est connu que les plaquettes sanguines favorisent la dissémination métastatique, mais les mécanismes mis en jeu ne sont pas clairement identifiés. L'objectif de cette étude est de mettre en place au laboratoire un modèle de métastase spontanée avec l'observation par imagerie du petit animal, dont les avantages sont :

1) De mimer plus fidèlement le processus métastatique que les modèles utilisés à ce jour au laboratoire.

2) De permettre une évaluation spatio-temporelle et non invasive de la formation de métastase à l'aide d'un bio-imageur. Les cellules tumorales émettent de la luminescence/fluorescence qui sera détectée dans l'animal entier sans euthanasie. Cette technique permet d'avoir plus d'information à différents temps en utilisant moins de souris.

3) De caractériser et mieux comprendre le rôle des plaquettes dans le processus métastatique. Les cellules tumorales seront inoculées dans des animaux dont le compte plaquettaire est augmenté ou diminué. Ou bien encore dans des animaux dont les plaquettes sont déficientes pour une molécule de signalisation importante.

Pour ce projet nous utiliserons au maximum 201 animaux (souris, *Mus musculus*). Si nous sommes dans l'incapacité de mettre au point le modèle de métastase spontanée, un minimum de 9 animaux sera utilisé pour ce projet.

Remplacer

Une meilleure compréhension des pathologies telles que le cancer et le développement des nouvelles thérapies nécessitent d'utiliser des animaux car ce phénomène implique des interactions complexes entre les différents organes, la circulation sanguine et le système immunitaire qui ne peuvent pas être modélisés in vitro.

Réduire

Le nombre d'animaux a été réduit au maximum tout en permettant une analyse statistique avec le test ANOVA, permettant notamment de valider la fiabilité du modèle. De plus, l'étude longitudinale avec l'utilisation du bio-imageur, une fois mise au point, permettra un suivi de l'animal tout au long de l'expérience, c'est-à-dire que pour un seul animal plusieurs temps pourront être évalués sans utiliser plusieurs souris. Cette technique constituera une avancée majeure qui permettra de significativement limiter le nombre d'animaux.

Raffiner

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 avec l'observation des expressions faciales et l'état des tissus où les injections ont été réalisées). Pour une majorité des procédures, les animaux sont placés dans des conditions d'anesthésie gazeuses (masque ou enceinte) et ils reçoivent une dose d'antidouleur avant et après la procédure. De plus, les conditions d'hébergement sont adaptées à l'état des animaux et les soins opportuns sont appliqués. Une fois traités, les animaux retournent dans leur cage d'origine avec leurs congénères.

10105 Les staphylocoques sont des bactéries pouvant causer des infections chez l'homme. L'une d'entre elles, le staphylocoque doré (*Staphylococcus aureus*) est, avec *Escherichia coli*, le premier responsable d'infections nosocomiales (c'est-à-dire contractées à l'hôpital). Deux exemples d'infections dues à *S. aureus*, à même d'être contractées en milieu hospitalier, sont les pneumopathies (c'est-à-dire une infection des poumons) et les péritonites (c'est-à-dire l'infection de la cavité contenant les organes abdominaux).

Le staphylocoque doré développe de plus en plus de résistance aux antibiotiques et devient en conséquence difficile à traiter. Cette bactérie est notamment résistante à un antibiotique nommé méthicilline. En 2014, l'organisation mondiale de la santé (OMS) estimait que, chez les personnes infectées par des staphylocoques dorés résistant à cet antibiotique, le risque de décès était de 64% supérieur à celui de personnes atteintes d'une forme non résistante de l'infection. L'OMS encourage donc fortement la recherche et l'innovation afin de trouver de nouveaux moyens de lutte contre ces phénomènes d'antibiorésistance.

Notre projet concerne à la fois la recherche fondamentale et appliquée. Il vise à déterminer dans quelle mesure une thérapie cellulaire consistant en l'apport de tissu adipeux riche en cellules mésenchymateuses, peut améliorer l'efficacité d'un antibiotique tel que la doxycycline, dans trois situations d'infection par *S. aureus*.

Les effets d'une infection sévère 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 reste donc une nécessité afin d'améliorer notre compréhension et les traitements actuels d'une des principales causes de mortalité dans le monde. Toutefois, à chaque fois que le mécanisme supposé le permet, les conditions testées *in vivo* sont restreintes aux conditions donnant les résultats les plus prometteurs sur les modèles *in vitro*.

Dans le cadre de ce projet nous utiliserons des modèles murins, avec un total de 2988 animaux sur une période de 5 ans, afin de réaliser sept procédures expérimentales de classe légère ou modérée. Les populations seront adultes avec un âge moyen de 8-12 semaines, et elles comprendront à la fois des mâles et des femelles.

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, notamment en simulant par ré-échantillonnage (tirage avec remise) ce qu'aurait été le résultat du test statistique utilisé pour des tailles d'échantillon variées, en se servant du premier réplica d'expérience pour affiner les réplicas suivants.

2) des points limites permettant de mettre fin à l'expérimentation pour les animaux en souffrance. Ces points limites reposent sur des signes cliniques dont l'état du pelage, l'activité spontanée et provoquée, l'aisance respiratoire ou le poids.

3) des règles d'élevage en accord avec la réglementation pour respecter le bien-être des animaux. Ceux-ci auront une alimentation et une hydratation facilitées par l'apport de gels nutritifs appétants. En cas de baisse de température corporelle, les animaux seront réchauffés. Enfin, des antalgiques

seront utilisés en présence de signes faisant suspecter une douleur sans atteinte des points limites. Cela permettra de limiter une souffrance inutile tout en rapprochant les conditions expérimentales des conditions de prise en charge d'un patient.

4) une valorisation de chaque animal avec un partage des prélèvements au sein de l'équipe de recherche.

10106 Notre établissement utilisateur accueille tous les ans de nouveaux étudiants et post-doctorants qui seront amenés à étudier des modèles murins de maladies génétiques rares. Ces modèles sont indispensables à l'étude de la physiopathologies des ces maladies et permettent d'évaluer l'efficacité de différentes approches thérapeutiques.^{[1][SEP]}

Afin de faciliter l'avancée des projets et de permettre à ces personnes de manipuler les animaux dans le respect du bien-être animal, nous proposons une formation aux gestes techniques les plus souvent appliqués au sein de notre animalerie : injections (voies intraveineuse, intrapéritonéale, sous-cutanée et intramusculaire) ainsi que l'intubation endotrachéale.

Cette formation sera donnée par des personnes précédemment formées et supervisée par le vétérinaire référent de l'animalerie afin d'améliorer le bien-être animal et de diminuer le nombre d'animaux utilisés dans les différents projets.

Sur 5 ans, nous estimons que 500 animaux seront utilisés à des fins de formation.

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, les souris seront stabulées par groupe de 5-6 dans des cages dont l'environnement sera enrichi à l'aide de maisonnettes en carton. Pour être en conformité avec la réglementation en vigueur et respecter la règle des 3R, les intubations seront réalisées sur des animaux anesthésiés et les volumes de sérum physiologique administrés lors des injections seront inférieurs à ceux recommandés par la réglementation. A l'issue de la procédure et avant le réveil de l'anesthésie, les animaux seront euthanasiés.

10107 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 euthanasiés en fin d'expérimentation et les tissus prélevés sont partagés afin de minimiser le nombre d'animaux utilisés. Des expériences de biochimie et de biologie moléculaire à partir des différents tissus collectés ainsi que des études sur cellules isolées seront effectuées en parallèle afin de réduire le nombre d'animaux utilisés. Ainsi, toutes les procédures de ce projet sont conçues pour respecter le principe des 3 R (Remplacement, Réduction, Raffinement). Le nombre total de rats utilisés sera de 110 sur l'ensemble de l'étude en combinant plusieurs approches expérimentales par différents expérimentateurs sur le même animal. Le but de ce projet étant de tester des candidats-médicaments ciblant des protéines préalablement identifiées afin de limiter l'hypertension pulmonaire. 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.

10108 Ce projet a pour objectif de valider l'utilisation du rat dans le cadre d'expérience préclinique et de mettre en œuvre toutes les procédures nécessaires pour obtenir des résultats quantitatifs en imagerie cardiaque TEP (tomographie à émission de positons). Les résultats obtenus seront alors considérés comme la référence lors de futurs projets de recherche utilisant les mêmes protocoles sur d'autres modèles animaux tels que la souris ou le primate non-humain.

Le projet proposé se place dans le cadre d'études cardiovasculaires. Il s'agit ici de reproduire les protocoles utilisés en routine clinique chez l'homme afin d'évaluer le flux sanguin des artères coronaires et du muscle cardiaque. Cet examen appelé « PET Myocardial Perfusion Stress Test » (PMPST) consiste en l'injection d'une molécule d'imagerie en deux étapes. En effet, cette évaluation sera réalisée au repos et après induction d'un stress cardiaque induit par l'injection d'un composé pharmaceutique (produit utilisé en routine clinique) qui reproduit les effets d'un effort physique ou de stress sur le cœur. Les images obtenues (en 2D et 3D) par cette technique différencient, grâce à une échelle de couleur, les zones saines perfusées (en rouge) qui captent le traceur radiomarqué des zones hypoperfusées pathologiques (en bleu) qui ne captent pas ou peu ce traceur. Cette technique permet donc par exemple de diagnostiquer les zones d'ischémie cardiaque après un infarctus, d'évaluer la fonction cardiaque ou d'évaluer les effets d'un traitement sur le cœur. C'est une technique fiable, précise et non invasive, qui permet à un animal d'être suivi sur plusieurs jours et d'être son propre témoin.

Afin de respecter la règle des 3 R sera respectée :

Remplacer : le but de l'étude étant de visualiser la fonction cardiaque lors d'une réponse au stress, celle-ci ne peut être faite sur des modèles de culture cellulaire.

Réduire : Nous utiliserons le nombre minimal d'animaux (6 par groupe + éventuellement 3 animaux supplémentaires pour remplacer une sortie d'étude précoce) pour pouvoir avoir des résultats significatifs. L'utilisation de l'imagerie TEP permet également de réduire le nombre d'animaux par groupe car le même animal peut être suivi longitudinalement.

Raffiner : Lors des séances d'imagerie les animaux seront anesthésiés, chauffés et les paramètres vitaux (fréquence cardiaque, température et fréquence respiratoire) enregistrés en continu. L'imagerie TEP n'est pas une technique invasive et douloureuse. Entre les séances d'imagerie, les animaux seront observés quotidiennement et les observations reportées sur une grille d'évaluation qui évaluera les signes éventuels de souffrance et les points limites et donc les actions à mener en fonction du score obtenu. Les animaux sont hébergés à plusieurs par cage avec un environnement enrichi.

10109 Le retard de cicatrisation cutanée est un problème de santé publique, survenant fréquemment chez les sujets traités par les glucocorticoïdes GC (ou ayant un syndrome d'hypercorticisme comme la maladie de Cushing), et au cours de maladies chroniques comme le diabète. Etant donné que les GC peuvent activer non seulement leur propre récepteur (récepteur glucocorticoïde, GR) mais aussi le récepteur minéralocorticoïde (MR), nous avons proposé que certains des effets cutanés indésirables des GC (atrophie cutanée, retard de cicatrisation) seraient liés à leur activation excessive et anormale du MR cutané. Appliquer localement, sur la peau, un antagoniste du MR (MRA) serait alors bénéfique.

Nous avons déjà montré que l'adjonction d'un MRA limite l'atrophie cutanée cortico-induite chez des souris, sur des explants de peau humaine en culture, et sur des volontaires sains, lors d'un essai clinique. Nous voulons maintenant tester des MRA sur le défaut de cicatrisation induit par les GC ou survenant au cours du diabète et du vieillissement.

Notre projet consiste à utiliser des modèles murins de cicatrisation retardée, pour :

(1) comprendre les causes de cette complication et de son maintien dans le temps et (2) tester des moyens thérapeutiques permettant d'améliorer cette complication.

L'utilisation de souris comme modèle de cicatrisation humaine a été validée, permettant d'avoir une vision intégrative des phases de la cicatrisation (intégrant des mécanismes à l'échelle de l'organisme entier, ce qui est impossible avec des cellules de peau en culture), de façon à proposer de nouvelles approches thérapeutiques chez l'homme. Pour la mise en œuvre des 3R, nous avons limité au maximum le nombre de souris par groupe (modèle de retard de cicatrisation induit par les GC, cicatrisation retardée du diabète), tout en préservant les effectifs nécessaires pour une

évaluation statistiquement significative des résultats malgré la dispersion biologique. Un total de 1500 souris sera nécessaire pour l'ensemble du projet qui va durer 5 ans : 810 souris traitées par le GC, 270 souris avec diabète de type I (induit par la streptozotocine), 270 souris avec diabète de type II (souris db/db) et 150 souris âgées de 9 mois. Les lignées transgéniques utilisées dans nos protocoles seront des femelles, les mâles étant utilisés par notre équipe pour d'autres protocoles. Les mesures de raffinement incluent une anesthésie générale pour la biopsie cutanée, une analgésie pré et post opératoire et un suivi quotidien de l'état de la souris, qui sont euthanasiées en cas de signe de souffrance.

10110 Les stéatoses hépatiques non alcooliques (NAFLD), encore appelées maladies du foie gras sont les maladies du foie les plus fréquentes dans les pays industrialisés associées à l'obésité et au diabète. La stéatose se caractérise par une accumulation de lipides dans le foie. Bien que souvent sans symptôme, cette accumulation peut générer un état inflammatoire du foie appelée stéato-hépatite non alcoolique (NASH). Ce stade favorise l'apparition d'une cirrhose et contribue au développement d'une tumeur du foie appelée carcinome hépatocellulaire (CHC). La compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans le développement de la stéatose est devenue un enjeu majeur de santé publique.

Notre projet de recherche vise à caractériser les altérations de la prolifération des cellules du foie (hépatocytes) lors de la maladie du foie gras. Nos travaux récents démontrent une altération du contenu en ADN (ploïdie) des hépatocytes dans la séquence NAFLD/NASH (à la fois à partir de modèles murins et de cohortes de patients). En effet, nous avons montré que des hépatocytes de ploïdie élevée apparaissent suite à un cycle de division pathologique en réponse à l'activation d'un système de sauvegarde contrôlant les altérations de l'ADN. Ces hépatocytes de ploïdie élevée seraient générés pour titrer les lésions à l'ADN définissant la ploïdie comme un processus permettant d'empêcher la transformation maligne des hépatocytes. De plus, on sait à l'heure actuelle, que les gènes contrôlant les dommages à l'ADN sont mutés chez l'homme dans le cancer du foie.

Dans ce projet, nous déterminerons les conséquences de la levée de ces points de contrôles dans la séquence NAFLD/NASH/CHC. Par ailleurs, des travaux récents ont identifié le facteur LECT2 comme un acteur essentiel influençant les populations immunitaires contrôlant le CHC. Ces travaux récents démontrent par ailleurs que le taux de LECT2 est graduellement augmenté dans la séquence NAFLD/NASH chez l'homme. Dans ce contexte, nous chercherons à identifier les conséquences de la délétion de LECT2 dans la séquence NAFLD/NASH/CHC. Les procédures expérimentales respecteront les exigences de remplacement, réduction et raffinement. Il est actuellement impossible de reconstituer un système ex vivo qui récapitule la séquence NAFLD/NASH/CHC. Le modèle de cancer étudié a été développé chez la souris pour permettre ce type d'étude. Nous projetons d'utiliser, dans les 24 mois, des souris mises sous régimes gras invalidés pour ATR, ATM, LECT2. Les expérimentations seront regroupées au maximum afin de réduire le nombre d'animaux et le nombre maximum de souris utilisées sera de 405. 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. En fonction des expérimentations, de la nourriture et du gel à haute valeur nutritive seront fournis, ainsi que des moyens supplémentaires pour maintenir la température corporelle si le statut des animaux le nécessite. 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.

10111 La réduction et/ou la suppression du stress lié à la contention des animaux lors des procédures expérimentales fait partie du raffinement des pratiques nécessaires à la mise en œuvre des protocoles de recherche. Cette optimisation des procédures contribue également à la récolte de données expérimentales moins 'polluées' par d'éventuels biais de natures comportementale et/ou physiologique induits par ce stress. Dans ce cadre, nous nous proposons de mettre en place une étude consistant à amener deux primates non humains, à collaborer lors d'administrations de sérum physiologique effectuées à l'aide d'un dispositif d'injection automatisé.

L'objectif de cette étude est triple :

- Ethique, pour une amélioration des pratiques expérimentales avec les primates non humains au sein des animaleries de la plateforme, et pour une implication active des animaliers dans ce projet et dans de futures études

- Pédagogique, puisque les diverses étapes de l'étude seront filmées et intégrées dans les programmes de formations réglementaires habilitées, dispensées par la plateforme.

- Expérimental, puisqu'il s'agira de comparer le degré d'inconfort / de contrainte engendré par l'utilisation d'un dispositif d'injection automatique calibré de deux façons différentes.

L'étude consiste, à l'aide d'un renforcement positif (une récompense, une friandise), à conditionner les animaux à accepter successivement des contraintes de plus en plus importantes. Il s'agira pour ces animaux d'apprendre à prendre un morceau de fruit de la main des soigneurs, puis de s'habituer à une réduction ponctuelle de l'espace en ignorant un système de contention constitué d'un fond coulissant, puis finalement de collaborer lors d'injections sous-cutanées lentes de petites quantités de sérum physiologique tiède. Lorsque ce dernier apprentissage sera acquis, nous observerons la réaction des animaux lors d'une injection plus rapide, à l'aide du même dispositif, et d'une quantité un peu plus importante de sérum refroidi. Ce type d'injection rapide d'un liquide froid est en effet reconnu chez l'homme comme étant légèrement plus douloureux que l'injection lente d'un liquide à température ambiante. Une réaction de retrait de l'animal qui aura accepté précédemment de collaborer lors d'une injection sensée être moins douloureuse, puis la comparaison de la durée des conditionnements aux deux dispositifs, permettra de valider l'hypothèse selon laquelle la qualité de l'apprentissage est en relation avec le niveau de contrainte auquel l'animal doit consentir.

Cette pratique amenant l'animal à 'nous laisser entendre' ce qu'il ressent, pourrait dans de futures études, être utilisée pour comparer différents dispositifs en terme de contraintes, avec les babouins, mais également avec d'autres espèces de primates. Elle pourra par exemple servir de procédure de base pour évaluer la douleur perçue en fonction de différents paramètres d'injection (vitesse, taille de l'aiguille, type de produit, etc.). Les points clés des différents temps forts (refus, consolidation du conditionnement) des apprentissages consécutifs seront filmés, de façon à servir de supports d'enseignement, et à objectiver les réponses des animaux. Ici, il s'agit de 2 babouins.

Remplacement : Les objectifs éthique et pédagogique sont spécifiquement orientés vers les primates non humains. Ceci : 1) pour une amélioration des pratiques expérimentales à destination de ces espèces en particulier, 2) pour enrichir les enseignements destinés aux utilisateurs de ces espèces, et, 3) dans le cadre de ces enseignements, pour remplacer l'utilisation physique des animaux par des films. L'implication des animaux dans l'étude est donc incontournable.

Réduction : Deux animaux seulement seront intégrés dans cette étude préliminaire et qualitative. Il s'agit par ailleurs d'animaux réutilisés, ces derniers ne sont pas naïfs, ils ont déjà participé à des protocoles comportementaux (utilisation d'écrans), et retourneront dans leur élevage d'origine une fois l'étude terminée.

Raffinement : Les babouins sont hébergés ensemble dans une grande volière de 24m³ (taille au-delà du maximum réglementaire) ; un programme d'enrichissement hebdomadaire est mis en place (jeux, vidéo, piscine, etc.) ; l'étude elle-même vise à obtenir la collaboration des animaux et à améliorer les procédures expérimentales auxquelles ces derniers seraient soumis dans de futures études. Une relation de confiance avec les soigneurs doit donc être construite, elle est nécessaire à la réussite des apprentissages.

10112 La toxoplasmose est une maladie parasitaire causée par le parasite *Toxoplasma gondii*. Le parasite peut être étudié in vitro en culture cellulaire, principalement par des manipulations génétiques, comme la génération de parasites n'exprimant plus une certaine molécule par exemple.

Les parasites générés sont des souches uniques qui sont propres au laboratoire dans lequel elles ont été générées. Leur étude nécessite de travailler avec des souches propres non contaminées. Or, lors de la culture cellulaire de nos mutants, des contaminations environnementales (bactéries, mycoplasmes) sont apparues, il est donc nécessaire de décontaminer les souches parasitaires. Cela nécessite leur inoculation chez la souris. En effet, le parasite est capable de s'y multiplier et en parallèle, le système immunitaire de la souris va éliminer les mycoplasmes ou les bactéries. Cela permet donc quelques jours après infection de récupérer des parasites propres.

Ce projet est donc consacré à la décontamination de 40 souches parasitaires. Nous respecterons la règle des 3R. Aucun modèle in vitro ne permet de décontaminer des souches parasitaires.

Au cours de ce projet, 80 souris seront manipulées sur une période de 5 ans. Nous avons prévu des groupes avec un nombre minimum d'animaux. De plus, les souris utilisées seront des souris de réforme, déjà présentes à l'animalerie.

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.

10113 Les facteurs de régulation de l'expression des gènes ont émergé récemment comme de nouvelles cibles des traitements anticancéreux. Parmi ceux-ci, les protéines "BET". Les protéines BET ont une expression et/ou une activité dérégulée dans les cancers dans lesquels elles sont des acteurs majeurs dans le maintien de leurs caractéristiques et la résistance thérapeutique. Ces protéines ont donc récemment émergé comme des cibles anticancéreuses nouvelles (inhibiteurs de BET : IBET). Bien que le potentiel thérapeutique des IBET soit actuellement étudié chez l'homme au cours d'essais cliniques contrôlés, nous avons apporté la preuve in vitro que ces molécules ont une toxicité sur les cardiomyocytes, les cellules qui permettent la contraction du cœur.

L'utilisation de ces molécules chez l'homme présente donc un risque de dysfonction cardiaque, potentiellement grave (insuffisance cardiaque), chez les sujets exposés.

Ce projet vise à évaluer la toxicité cardiaque des IBET chez le rat pour confirmer ou infirmer ce risque in vivo.

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 euthanasiés 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 (Remplacement, Réduction, Raffinement). L'utilisation d'animaux représente la seule alternative dont nous disposons entre nos résultats obtenus in vitro avec les IBET et leur utilisation chez l'homme.

Le nombre total de rats utilisés sera de 72 sur l'ensemble de l'étude en combinant plusieurs approches expérimentales par différents expérimentateurs sur le même animal.

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.

Au vu de l'engouement pour les IBET dans le domaine du cancer, ce projet présente une utilité de santé publique majeure si l'on considère leur toxicité in vitro.

10114 La migraine se caractérise par des crises de céphalées accompagnées de nausées et/ou vomissement et d'une hypersensibilité à de nombreux stimuli (olfactifs, visuels, auditifs, mécaniques). Cette hypersensibilité notamment mécanique (allodynie=stimulus mécanique léger comme le toucher ressenti comme une douleur) constitue aussi un marqueur de progression de la migraine vers le stade chronique. Cette hypersensibilité est aussi la traduction d'une sensibilisation centrale des réseaux neuronaux et en particulier au niveau du premier relais central des afférences céphaliques : le noyau spinal du trijumeau. Dans ce noyau, sont présents des neurones qui reçoivent des messages en provenance du tissu cutané mais aussi des neurones dont le champ

récepteur se situe au niveau des méninges qui jouent un rôle central dans la physiopathologie migraineuse.

Les résultats des études précédentes ont pu montrer que l'injection systémique répétée (1 injection/jour/5 jours) d'isosorbide dinitrate (ISDN, 10mg/kg) entraîne chez le rat une allodynie mécanique faciale (abaissement du seuil du réflexe (nociceptif) de retrait de la face) et une sensibilisation centrale (potentialisation) des réponses neuronales trigéminales aux stimulations électriques périphériques cutanées. Dans le but de mieux comprendre les mécanismes neuro-physiopathologiques de la migraine (pour améliorer les thérapeutiques antalgiques) et dans le cadre du développement du modèle de migraine par donneur de monoxyde d'azote (NO) (ici ISDN), ce projet vise à analyser les réponses aux stimulations nociceptives des neurones trigéminaux dont le champ récepteur se situe au niveau méningé. En effet, le projet précédent portait sur l'analyse des neurones à champ récepteur cutané et c'est donc pour compléter ce travail que nous envisageons le présent projet. A notre connaissance, il n'existe objectivement aucune méthode alternative pour ce type d'étude.

Après avoir évalué le développement d'une allodynie mécanique faciale chez les rats soumis à 4 injections d'ISDN, nous pourrions, par une approche électrophysiologique extracellulaire unitaire, enregistrer chez le rat anesthésié, les activités nociceptives des neurones dans le noyau du trijumeau, en réponses à des stimulations électriques méningées et recevant une injection d'ISDN lors de l'enregistrement électrophysiologique. Pour cette étude, le nombre de rat par groupe sera limité au minimum tout en permettant de discriminer un effet significatif entre les traitements et calculé par tests statistiques adaptés. Chaque animal est enregistré en conditions témoins avant injection la dernière injection d'ISDN ce qui contribue au respect du "R" réduire. Deux groupes de rats seront nécessaires : 1 groupe qui aura subi une série d'injections répétées de sérum physiologique et 1 groupe qui aura reçu les injections d'ISDN. Sachant que l'ISDN induit une allodynie sur 70 à 80% des rats et que le taux de réussite pour enregistrer un neurone à champ méningé est de 50 % environ, nous estimons que le nombre de rats nécessaire pour discriminer un effet significatif sera de n=15 pour le groupe témoin (sérum physiologique) et n=35 pour le groupe injections répétées d'ISDN. Au final donc le nombre d'animaux utilisé sera de 50 rats.

Concernant nos méthodes visant à respecter le "R" de Raffiner, il est à noter que nos animaux sont sous anesthésie générale lors des enregistrements électrophysiologiques. Concernant les périodes des 5 jours pendant lesquelles les animaux reçoivent les injections répétées (1/jour) d'ISDN, les animaux sont hébergés dans des cages standards bénéficiant d'un enrichissement social et environnemental adapté avec visites quotidiennes. De plus les animaux sont manipulés lors des séances de vérification de l'installation de l'allodynie qui est mesurée par l'application de fins filaments plastiques, calibrés en force, sur la face pendant 3 sec. La mesure consiste à déterminer quel est le filament le plus faible en force capable de déclencher un réflexe de retrait (nociceptif) de la face. Ainsi les animaux sont soumis à de très faibles stimulations nociceptives tant en durée qu'en intensité.

Ce projet doit permettre de mieux caractériser et comprendre la sensibilisation centrale présente dans les états migraineux et responsable notamment du stade chronique provoqué ici, chez le rat, par des "crises" répétées induites par le donneur de NO (ISDN). Cette meilleure compréhension reste un préalable indispensable à l'amélioration de la thérapie anti-migraineuse.

10115 Le glioblastome est une tumeur cérébrale dont le pronostic est très péjoratif avec une survie médiane de 15 mois malgré un traitement combinant chirurgie, chimiothérapie et radiothérapie, ce qui nécessite de trouver urgemment de nouvelles solutions thérapeutiques. La vectorisation de médicaments est un véritable enjeu dans la prise en charge thérapeutique des patients cancéreux. Le paclitaxel (PTX) est une molécule utilisée en clinique mais de structure très hydrophobe, propriété qui limite sa bonne pénétration cellulaire et qui restreint son emploi. Une méthode efficace pour améliorer l'efficacité du PTX serait de le transformer en actif plus hydrosoluble et de taille nanométrique afin de modifier son mécanisme de pénétration intracellulaire et faciliter son internalisation. Nous avons démontré l'innocuité, la biocompatibilité et l'internalisation des nanoparticules de carbone (CNPs) sur plusieurs lignées cellulaires cancéreuses in vitro (incluant

des lignées de glioblastome). De plus, l'activité anti-cancéreuse des CNPs couplées à du paclitaxel (CNPs-PTX) a été validée par plusieurs tests in vitro. Par ailleurs les CNPs-PTX sont hydrosolubles. Un autre facteur important limitant l'accès des agents anti-cancéreux au cerveau est la présence de la barrière hémato-encéphalique (BHE). Il s'agit d'une barrière de cellules qui bloque le passage de certains agents anti-cancéreux (dont le PTX) du compartiment sanguin vers les cellules du cerveau. Nous disposons d'un appareil adapté aux petits animaux permettant une ouverture temporaire et localisée de la BHE par ultra-sons. Ainsi, la barrière peut être très localement rompue par application d'ultrasons, uniquement au niveau de la tumeur. Il en résulte un passage des agents anti-cancéreux uniquement vers le site tumoral en épargnant le tissu sain cérébral environnant (moins d'effets secondaires). L'utilisation de CNPs-PTX associée à une ouverture de la BHE déclenchée par ultrasons pourrait ainsi constituer une approche prometteuse dans le traitement du glioblastome.

L'objectif de cette demande consiste à apporter la preuve de concept in vivo de l'activité pharmacologique des CNPs-PTX après ouverture de la BHE par ultrasons, par l'intermédiaire de plusieurs études :

- 1) Une étude de détermination de la dose maximum tolérée de CNPs-PTX pour déterminer la dose de CNPs-PTX à utiliser lors des traitements anti-tumoraux in vivo.
- 2) Le dosage dans le sang au cours du temps des CNPs-PTX chez l'animal après administration intraveineuse. En effet, il est nécessaire de connaître le temps après injection, où les CNPs-PTX sont présentes dans le sang en quantité maximum, avant d'être éliminées. Nous provoquerons l'ouverture de BHE dans le cerveau à ce temps précis, pour permettre le passage d'une quantité maximale de CNPs-PTX dans la tumeur.
- 3) Une étude d'efficacité anti-tumorale sur souris greffées avec des cellules humaines de glioblastome en orthotopique.

Deux types de traitements seront envisagés :

- a) Le traitement (CNPs-PTX) s'effectuera d'abord directement dans la tumeur. Ces premières expériences nous permettront de savoir si les CNPs-PTX induisent un effet anti-tumoral, indépendamment de la présence de la BHE, puisque les particules seront injectées directement au sein de la tumeur. Si le médicament n'apporte aucune efficacité anti-tumorale à ce stade-là, le projet prendra fin, il ne sera pas utile d'effectuer les expériences suivantes (administration des CNPs-PTX en intraveineux après ouverture ou non de la BHE).
- b) Le traitement (CNPs-PTX) sera administré en intraveineux et associé à une ouverture temporaire de la BHE par ultra-sons.

Dans le souci du respect de la règle des 3R, cette étape de validation in vivo est indispensable avant toute évaluation clinique chez le patient. Il n'existe à l'heure actuelle, aucune autre méthode qui pourrait se substituer à l'expérimentation animale dans ce domaine. Le nombre d'animaux prévus dans chaque groupe sera basé sur un calcul d'effectif permettant de prédire que nous avons 80% de chance d'arriver à un résultat statistiquement significatif. Pour le bien-être de l'animal, les souris seront logées selon les normes requises avec un enrichissement (copeaux de bois, dômes) et en groupes de 4 à 6 individus par cage (365x205x140 cm, 530 cm²) afin d'éviter le stress de l'isolement. Outre l'anesthésie durant la chirurgie, nous prévoyons d'administrer de l'analgésie en péri- et post-opératoire si nécessaire. Après la greffe nous suivrons la progression de la pathologie en mesurant le poids des animaux quotidiennement, en observant tout changement dans leur comportement ou l'apparition de signes cliniques (posture, prostration, difficultés à se déplacer et à s'alimenter, déshydratation, ataxie) et en nous appuyant sur une grille d'évaluation de la douleur. Lorsque les souris présenteront une perte de poids supérieure ou égale à 20% de leur poids initial ou si des signes cliniques apparaissent, les animaux seront euthanasiés sans délai.

Au total, un maximum de 248 souris est prévu pour la globalité de l'étude.

10116 Notre processus de production assure la production 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 anticorps sont sécrétés par des lymphocytes différenciés après activation par un immunogène. 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 leur 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. 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 anticorps monoclonal 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 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 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).

L'approche envisagée pour l'obtention d'AcM, se base sur la technique d'hybridation cellulaire. Son principe repose sur deux étapes principales, à savoir :

- injection d'une protéine d'intérêt (antigène) à des souris, afin de permettre la production, par des lymphocytes B, d'anticorps dirigés contre cette molécule qui est reconnue par le modèle murin comme du « non-soi ».

- les lymphocytes B isolés à partir de la rate et des ganglions lymphatiques des souris immunisées, seront fusionnés à une cellule immortelle de myélome murin, afin de générer une cellule hybride, nommée hybridome, capable de proliférer indéfiniment et de produire in vitro des anticorps. Chaque hybridome produira uniquement l'anticorps monoclonal synthétisé par son lymphocyte parental.

Les 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 souris reste l'animal le plus utilisé pour l'obtention d'AcM, car le génome des souris présente environ 95% d'homologie avec celui de l'homme. De plus, les souris sont des animaux de petites tailles 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 de protocoles et d'animaux par protocole, nous faisons une demande pour 50 protocoles, représentant 150 souris.

Le temps minimum d'immunisation des souris sera de 39 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 modéré. La procédure peut engendrer de la fièvre chez l'animal, dans les 24 heures suivant l'immunisation.

Les animaux sont surveillés tous les jours (y compris le week-end) et plus particulièrement durant les premières heures juste après l'immunisation. Au cours du processus d'immunisation, des échantillons de sang de l'animal seront prélevés en début et fin de protocole pour évaluer le niveau de production d'anticorps (évaluer la réponse immunitaire).

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.

10117 La polyarthrite rhumatoïde (PR) est une maladie chronique, inflammatoire touchant 0.3% de la population française (250.000 patients en France). Cette pathologie entraîne des douleurs autant lorsque l'articulation est au repos que lorsque le patient se sert de celle-ci. Les causes sont inconnues : facteurs génétiques, facteurs environnementaux (fumer augmente le risque de développer une PR) ou existence d'autres pathologies comme le psoriasis au cours duquel les patients accumulent inflammation de la peau et des articulations. La PR est une maladie qui réduit non seulement la qualité de vie mais également l'espérance de vie. Les traitements actuels peuvent permettre une rémission chez une minorité des patients alors qu'ils sont transitoirement efficaces voir inefficaces chez d'autres patients.

L'un des modèles les plus pertinents pour explorer cette pathologie est l'arthrite expérimentale au collagène. Cependant, les résultats obtenus avec ce modèle peuvent être influencés par l'environnement dans lequel est réalisé l'expérience. L'objectif de ce projet est d'étudier l'impact de l'environnement sur l'apparition et le développement des arthrites chez la souris, afin de déterminer les meilleures conditions d'utilisation de ce modèle.

L'utilisation des souris dans cette étude se fera en accord avec la règle des 3R. Le nombre d'animaux utilisés sera réduit au maximum afin de permettre des analyses statistiques solides. Ce projet de recherche nécessitera l'utilisation de 135 souris au maximum, sur 2 ans. Des points limites destinés à limiter l'inconfort et la douleur des souris seront mis en place dans chaque expérience et tous les animaux seront pesés et leur comportement surveillé afin de veiller à leur bien-être.

10118 Pour étudier plus finement la valeur alimentaire des aliments en termes d'apports nutritifs, des études de cinétiques de dégradation d'aliments « in situ », c'est-à-dire dans le milieu physico-chimique et biologique du rumen des essais seront réalisés sur des vaches fistulées logées dans la station, dans une installation spécifique. Ces essais permettent en outre d'estimer les risques potentiels sur la santé des animaux via les risques acidogènes des aliments testés. Les travaux conduits sur la valeur alimentaire des aliments des ruminants, concernent en particulier les nouveautés qui ne figurent pas dans les tables de références ou pour lesquels il n'y a pas d'équation de prédiction satisfaisante (coproduits industriels, mélanges graminées-légumineuses, additifs alimentaires, ensilages récoltés « secs », etc.). Ces références serviront ensuite comme au quotidien dans les élevages à ajuster la ration des bovins pour améliorer les performances zootechniques, sanitaires et environnementales des exploitations agricoles. Si ce travail n'est pas réalisé, la table d'alimentation et donc la formulation seront en décalage avec la réalité du terrain, l'aliment sera mal valorisé par l'animal : il faudra une quantité supérieure d'aliment pour couvrir ses besoins, les rejets via les fèces et les urines, voire les éructations seront plus importants, augmentant ainsi l'impact environnemental des élevages.

Une mauvaise valorisation de l'aliment peut également entraîner une diminution du bien-être animal (perte d'état pendant la période de production laitière, risque d'acétonémie et de stéatose, etc.). Cette caractérisation à partir d'analyses chimiques uniquement reste problématique et les techniques in vitro ne permettent pas une détermination précise de la digestibilité des différents nutriments. Ainsi, la mesure in vivo reste indispensable. La présente saisine concerne donc le projet d'étude de la dégradation « in situ » de certains aliments à travers plusieurs essais à protocole standard.

Pour obtenir les cinétiques de dégradation des aliments, le protocole expérimental nécessite que les échantillons à étudier soient introduits dans un certain nombre de petits sachets en tissu synthétique puis placés dans le rumen des vaches fistulées via la canule ruminale. Ces sachets sont ensuite retirés au bout de temps d'incubation échelonnés.

La différence entre la quantité de matière sèche initiale et la quantité de matière sèche du résidu final, exprimée en pourcentage, permet d'obtenir des données de « dégradation ». Les différents résultats de dégradation à plusieurs durées d'incubation constituent une cinétique de dégradation et les différentes répétitions (plusieurs vaches x plusieurs dates d'incubation) permettent des

traitements statistiques robustes sur les données recueillies. Les essais qui seront réalisés dans ce projet se distingueront donc uniquement sur le contenu (=aliment) du sachet nylon.

Après un premier traitement statistique, les cinétiques de dégradation des aliments obtenues permettent d'apprécier directement le risque acidogène avec la vitesse de dégradation dans les premières heures d'incubation dans le rumen. La valeur énergétique de l'aliment sera approchée par le résidu « matière sèche non dégradé en 48 heures d'incubation » et la valeur azotée par la dégradabilité de la MAT dans le rumen. Ces résultats obtenus sont ensuite publiés pour être mis à disposition de tous.

Remplacement et Réduction : Par rapport à la méthode de digestibilité sur montons, les essais réalisés sur vaches fistulées limitent le nombre d'animaux utilisés (réduction de 50% minimum) tout en permettant d'obtenir des résultats fiables sur un plus grand nombre de matières premières. Les techniques *in vitro*, en cours de développement ne permettent pas pour le moment de supprimer les essais sur animaux. Le renouvellement des vaches fistulées est rare les essais conduits sur ces animaux nécessitent peu d'individus (4 par essai), les essais sont non invasifs. Un essai dure 1 à 2 semaine(s). Deux à cinq essais sont menés chaque année sur les 5 vaches fistulées présentes sur la station. Ces vaches sont peu sollicitées car elles sont tarées. D'ailleurs, leur durée de vie peut atteindre 20 ans comparativement à une vache laitière en production (5-7 ans). La durée totale d'intervention expérimentale (avec contention) sur les animaux est d'environ 120 h sur toute la durée de vie d'une vache. Les animaux sont logés en stabulation libre ou au pâturage le restant du temps.

Raffinement : Lorsque les animaux sont en essai (de fin septembre à fin juin), les vaches sont élevées dans un bâtiment sur une aire matelassée avec sciure épandue quotidiennement.

En été, pendant la période hors essai, les animaux sont mis à l'herbe. Le reste de l'année, elles sont nourries avec un régime composé de foin, de maïs fourrage, céréale et tourteau.

10119 Le développement du système nerveux central au cours de l'embryogenèse reste très mal compris notamment chez les mammifères. Des activités rythmiques endogènes observées dans toutes les structures neurales sont essentielles pour l'établissement de connexions fonctionnelles au niveau des circuits neuronaux. Toutefois, l'origine et la dynamique de ces activités électriques restent largement méconnues. Certaines activités rythmiques supposées spontanées pourraient en fait être générées au niveau bulbo-spinal par le mouvement du liquide physiologique autour du tissu immature.

L'objectif de ce projet est de mieux comprendre l'origine et les mécanismes sous-tendant ces activités électriques au cours du développement.

Les activités électriques seront enregistrées sur des préparations de moelle épinière/tronc cérébral provenant d'embryons de souris avec de électrodes extracellulaires et/ou par succion des racines ventrales de la moelle épinière. Afin d'étudier les cellules ou groupe de neurones impliqués dans ce mécanisme, des préparations de système nerveux central seront analysées par des méthodes de biologie moléculaire, biochimiques et immuno-histologiques.

Notre protocole expérimental respecte la règle des 3 R : remplacement, réduction et raffinement.

Il n'existe actuellement pas d'alternative au modèle rongeur utilisé pour réaliser ce travail. En effet, les mécanismes étudiés mettent en jeu des réseaux complexes de cellules que la culture de cellules ne saurait reproduire. Il est donc nécessaire de recourir à un modèle animal. Le modèle le plus approprié étant le modèle murin, l'enregistrement de signaux électriques sera effectué *ex vivo* sur des préparations de moelle épinière/tronc cérébral provenant d'embryons de souris à différents stades de développement.

Le nombre d'animaux utilisés est réduit pour atteindre une valeur minimale sans nuire à la qualité et la reproductibilité des données. Afin de réduire au maximum le nombre d'embryons utilisés, les préparations de moelle épinière/tronc cérébral seront récupérées pour effectuer des marquages immuno-histochimiques. De même, afin de réduire le nombre de mères gestantes, certaines expérimentations seront combinées.

Les mères gestantes seront hébergées dans une structure et des conditions parfaitement adaptées (litière changée régulièrement, eau et nourriture à volonté, température et hygrométrie régulées, etc.). Les animaux bénéficient également d'un enrichissement de leur milieu permettant une

diminution du stress potentiel des animaux. Enfin, la souffrance éventuelle des animaux sera minimisée autant que possible.

L'étude en elle-même nécessitera l'utilisation de 1440 embryons au total.

10120 La Leucémie Myéloïde Chronique (LMC) est un cancer du sang dû à l'apparition d'une anomalie dans la cellule souche sanguine, cellule à l'origine des différentes cellules du sang. Cette anomalie correspond à la fusion de deux chromosomes induisant la création d'un gène de fusion : le gène BCR-ABL1. La présence du gène BCR-ABL1 entraîne une surproduction de globules blancs (un des premiers symptômes de la LMC). Dans les années 2000, les industries pharmaceutiques ont développés des médicaments qui bloquent spécifiquement l'activité de la protéine BCR-ABL1 et par conséquent empêchent la surproduction de globules blancs. Ces traitements ont été révolutionnaires mais ils provoquent chez certains patients des effets secondaires tels que des nausées, des douleurs musculaires, des œdèmes ou des diarrhées. Des essais cliniques visant à arrêter le traitement après plusieurs années ont permis de montrer que 40% des patients restent sans traitement et sont donc guéris. Cependant, 60% des patients rechutent démontrant la présence des cellules souches sanguines leucémiques dans leur moelle osseuse qui n'ont pas été éliminées par le traitement. Ce médicament seul ne suffit donc pas.

Notre projet est donc d'établir un nouveau modèle de souris qui reproduira fidèlement la LMC humaine. L'étude de ce modèle nous permettra ensuite de caractériser les cellules souches leucémiques résiduelles et de trouver d'autres médicaments qui pourraient éliminer ces cellules souches sanguines leucémiques anormales qui résistent au traitement. Pour cela, nous avons besoin d'établir deux nouvelles lignées transgéniques successives. La création de ces lignées et croisements nécessitera environ 1026 souris transgéniques (tous génotypes confondus).

Dans le respect de la règle des 3R :

Remplacement : Ce type d'analyse nécessite l'utilisation d'animaux puisqu'à l'heure actuelle, aucun modèle in vitro n'est capable de représenter la complexité des mécanismes qui conduisent à la leucémie myéloïde chronique.

Réduction et Raffinement : les lignées transgéniques utilisées comportent 1. des systèmes qui vont permettre l'expression des transgènes soit dans un tissu spécifique soit à un temps donné et 2. des systèmes qui vont permettre d'analyser finement et spécifiquement l'évolution des cellules leucémiques et ainsi permettre à la fois de diminuer le nombre d'animaux utilisés mais également de détecter l'apparition de cellules leucémiques très précocement ce qui permettra d'améliorer le bien-être animal par une prise en charge plus rapide. De plus lors de l'établissement des lignées, l'élevage sera minimisé le plus possible pour ne produire que les animaux nécessaires. Le bien-être de nos animaux sera pris en compte de leurs naissances à leurs morts, les animaux seront hébergés en groupe et l'enrichissement de leur milieu de vie sera systématique. Nous vérifierons que les modifications géniques apportées lors des croisements ne provoquent pas de phénotypes nocifs. Ainsi, la surveillance des souris sera faite quotidiennement ce qui permettra, si le constat d'un phénotype nocif est fait, de prendre des mesures spécifiques pour le bien-être de ces animaux.

10121 L'augmentation des maladies métaboliques est considérée par l'OMS comme un problème majeur de santé publique au niveau mondial. En effet, avec les changements des habitudes alimentaires, et en particulier avec l'augmentation de la prise de graisses saturées et de sucres rapides, la prévalence de maladies métaboliques comme l'obésité et le diabète ne cesse de croître. Il y a maintenant dans le monde 39% des adultes qui sont en surpoids, et 13% qui sont obèses. L'obésité est un facteur de risque important pour le diabète de type 2, et 285 millions de personnes dans le monde sont aujourd'hui atteintes de cette maladie.

Nous nous intéressons au rôle des nutriments (comme le glucose et les acides gras) dans les perturbations métaboliques et hormonales observées dans ces maladies. L'obésité et le diabète sont associés à une inflammation chronique « à bas bruit » qui joue un rôle majeur dans le développement et l'aggravation des altérations métaboliques et hormonales au cours du temps. Cette inflammation est liée au recrutement des macrophages (cellules sanguines médiatrices de l'inflammation) dans les tissus comme le foie, le tissu adipeux et le pancréas. L'hyperglycémie joue

un rôle important dans ces processus inflammatoires. Nous nous intéressons au rôle de l'hyperglycémie dans les processus inflammatoires dans les macrophages de souris.

Dans ce projet, il sera nécessaire de faire ces expériences sur des animaux pour étudier les conséquences d'une nutrition enrichie en sucres et en graisse afin de mimer le régime alimentaire consommé dans les sociétés occidentales. Nous étudierons chez ces animaux la réponse à une administration orale de glucose et intrapéritonéale d'insuline. Nous leur administrerons également par voie orale ou intrapéritonéale des molécules et analyserons les conséquences de ces administrations sur les paramètres sanguins hormonaux, métaboliques et inflammatoires. Enfin, nous prélèverons et étudierons en post mortem les tissus et cellules issus de ces animaux.

Le projet est prévu sur 5 ans et utilisera 400 souris. Nous utiliserons différentes lignées de souris génétiquement modifiées ne présentant pas de phénotype dommageable pour étudier dans les macrophages les mécanismes impliqués dans l'inflammation associée à l'obésité et au diabète. Les souris seront nourries avec un régime standard ou avec un régime riche en sucres et en graisses

Respect du principe des 3R :

L'effet d'un régime de type « occidental » ne peut être étudié que sur des animaux nourris avec ce régime pendant plusieurs semaines. Nous avons cependant déjà effectué in vitro, sur des lignées cellulaires de macrophages, toutes les mises au point techniques nécessaires à nos études et nous avons déjà identifié, sur ces lignées, les cibles moléculaires que nous étudierons dans les macrophages de souris en post mortem.

Pour chaque animal, les macrophages seront isolés à la fois à partir du péritoine et à partir de moelle osseuse, ce qui permettra de tester plusieurs conditions expérimentales en parallèle, et de réduire au minimum le nombre d'animaux utilisés.

Les animaux seront placés dans un environnement enrichi répondant aux normes établies, et seront surveillés pendant toute la durée de l'étude (poids, glucose sanguin).

A terme, ce projet qui vise à faire progresser la compréhension des dérégulations métaboliques et leur rôle dans l'inflammation chronique associée, permettra de proposer de nouvelles cibles moléculaires pour soigner ces maladies.

10122 Les cancers de l'intestin sont très fréquents chez l'homme, en France étant au troisième rang des cancers les plus fréquents. Certaines de ces tumeurs sont d'origine génétique, comme chez les patients atteints par la polypose adénomateuse familiale (PAF). Cette pathologie, due à des mutations d'un gène suppresseur de tumeurs, se caractérise par la formation dans l'intestin des patients de plusieurs dizaines de polypes qui se transforment en cancers s'ils ne sont pas éliminés. Par conséquent, une résection préventive du colon est pratiquée chez ces patients dès l'âge de vingt ans.

Des recherches récentes ont révélé le rôle essentiel du système immunitaire dans le contrôle de la formation des cancers. Cependant, la réponse immune n'est pas toujours efficace pour différentes raisons, permettant ainsi au cancer de se développer. Le but de ce projet est de comprendre si les mutations du gène responsable de la polypose adénomateuse familiale altèrent le fonctionnement du système immunitaire, quels sont les mécanismes moléculaires impliqués et si ce dysfonctionnement de l'immunité joue un rôle dans le développement des tumeurs.

Afin de répondre à ces questions, nous conduirons des expériences en utilisant une lignée de souris mutantes qui développent spontanément des polypes et des tumeurs intestinales de façon similaire aux patients atteints de polypose familiale. Ce modèle expérimental nous permettra de comprendre si la même mutation induisant la polypose altère le fonctionnement des cellules du système immunitaire, telles que les lymphocytes T régulateurs ou cytotoxiques, ou encore des cellules « natural killers », qui jouent un rôle essentiel dans l'élimination des cellules tumorales.

Au total, nous prévoyons d'utiliser 388 souris, mâles et femelles, d'âge comprise entre 7 et 14 semaines. Cette étude, qui devrait s'étaler sur 5 ans, implique 6 procédures expérimentales dont une ayant un degré de sévérité léger et cinq de sévérité modérée. L'ensemble de ces procédures nous permettra de comprendre si le système immunitaire des souris mutantes se développe normalement, s'il est capable de monter une réponse anti-tumorale, spontanément ou après une vaccination spécifique, et si les cellules immunitaires portant cette mutation sont capables d'infiltrer le tissu tumoral et de tuer les cellules cancéreuses.

Les résultats attendus de ce projet devraient permettre une meilleure compréhension des mécanismes permettant au système immunitaire de prévenir le développement de la polypose familiale et des cancers intestinaux. Ils pourraient ainsi suggérer des nouvelles pistes pour améliorer la thérapie et les conditions de vie des patients.

Les souris mutantes développent des tumeurs de l'intestin au-delà de 10 semaines d'âge et leur espérance de vie est réduite par rapport aux souris sauvages. Le développement des tumeurs s'accompagne d'anémie et de perte de poids. Ces souris seront surveillées pour détecter les signes pathologiques et limiter leur souffrance. Les animaux seront euthanasiés dès que l'un des points limites définis dans nos protocoles sera atteint.

Pour certaines expériences, la moelle osseuse de souris receveuses sera détruite par irradiation, puis reconstituée par transplantation de celle dérivée de souris mutantes. Ces manipulations pourraient induire fatigue et perte d'appétit pendant quelques jours. Le niveau de sévérité attendu est modéré. Tous les animaux utilisés seront euthanasiés à la fin de l'étude.

Le recours à l'animal est nécessaire dans nos études car ils n'existent pas d'approches in vitro permettant de tester le développement des cellules immunitaires ni l'efficacité de la réponse immune anti-cancéreuse dans son ensemble. Néanmoins, des expériences in vitro seront conduites en parallèle afin de disséquer les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans les éventuelles altérations immunitaires dues à la mutation et réduire autant que possible les expériences sur les animaux.

Pour toutes les expériences, nous utiliserons le nombre minimum d'animaux permettant d'obtenir des résultats fiables. Ce nombre sera estimé sur la base de notre expérience précédente et/ou des données de la littérature. De plus, nous conduirons au début de l'étude, des expériences pilotes avec un nombre réduit d'animaux afin d'évaluer la variabilité des résultats et affiner le nombre d'animaux nécessaires pour chaque expérience. Nous ferons également recours à des biostatisticiens pour définir le nombre minimum d'animaux permettant d'atteindre nos objectifs.

Toutes les souris seront élevées en groupe avec une litière appropriée, avec de moyens d'enrichissement. Elles seront soumises à un suivi régulier au cours de l'élevage et à des contrôles journaliers lors des protocoles expérimentaux par les personnes participant au projet. Pour les expériences d'irradiation et reconstitution de la moelle osseuse, les souris recevront des doses de radiations suffisantes pour atteindre nos objectifs tout en réduisant au maximum les effets indésirables. Dans les 10 jours suivant l'irradiation, elles seront traitées par antibiotiques afin de limiter le risque d'infection et leur état clinique sera surveillé.

10123 Les cancers du sein triple négatifs (CSTN), dont la fréquence est de 15 à 20% des cancers mammaires, représentent le sous-type de cancer du sein le plus agressif principalement lié à l'apparition de clones chimio-résistants dotés de propriétés métastatiques accrues. Les métastases observées dans plus de 40% des CSTN apparaissent souvent dans les trois ans qui suivent la première ligne de chimiothérapie, ce qui assombrit d'autant le pronostic. Ce triste constat exige le besoin de nouvelles stratégies thérapeutiques et/ou de nouvelles cibles moléculaires pour les femmes atteintes de CSTN.

Une approche possible pour ce type de cancer peut être de modifier la synthèse de protéines dérégulées dans les cellules de CSTN et mener à la mort cellulaire et/ou à l'inhibition de la résistance aux traitements. L'inhibition de la synthèse de protéines est possible en utilisant des petits ARN interférents (short interfering RNAs ou siRNAs). Cependant l'administration des siRNA par voie intraveineuse est difficile car leur fragilité mène à leur dégradation rapide une fois dans le sang. Pour protéger les siRNA et obtenir une spécificité de délivrance cellulaire et intracellulaire, nous développons des nano-vecteurs magnétiques de siRNA (NVM-siRNA) qui permettront de transporter les siRNA dans les cellules cancéreuses. Ces nano-systèmes présentent l'avantage d'être des agents théranostiques doués de propriétés thérapeutiques (par vectorisation et délivrance des siRNA) et diagnostiques (car ce sont des agents de contraste en IRM et en imagerie de fluorescence in vivo).

Après avoir validé in vitro leur efficacité, le projet proposé vise à évaluer l'efficacité des NVM-siRNA in vivo sur un modèle de xénogreffe de CSTN induit chez la souris.

Les objectifs sont :

- 1) d'étudier la biodistribution des nano-vecteurs à l'aide de méthodes d'imagerie complémentaires et non invasives : IRM, échographie 3D et/ou imagerie optique (fluorescence, bioluminescence).
- 2) de mesurer la réduction tumorale et apprécier l'efficacité des traitements à base de siRNA nano-vectorisés (associé ou non à une chimiothérapie de référence).

La règle des 3R sera scrupuleusement respectée.

Remplacement : L'utilisation des animaux se justifie par le fait que nous essayons d'imager et de cibler des tumeurs le plus précocement possible et nous avons absolument besoin de connaître le potentiel de ciblage et la sensibilité de nos NVM-siRNA in vivo. Il n'y a donc pas d'alternatives.

Réduction : Le nombre d'animaux par groupe (8) a été réduit au maximum sans mettre en péril l'obtention de résultats nécessaires à la validation de l'hypothèse scientifique. Le nombre total d'animaux est de 360 souris sur une période de 5 ans, ce qui représente 72 animaux/an.

Raffinement : Le modèle animal utilisé a été choisi en prenant en compte l'état actuel des connaissances sur le sujet. Le milieu des animaux pendant la durée de l'expérimentation sera enrichi avec du papier absorbant et des cabanes de cellulose. Les traitements réalisés et les imageries se feront sur souris anesthésiées.

10124 Les traumatismes crâniens touchent 155 000 personnes chaque année en France. Les jeunes adultes âgés de 15 à 30 ans, et notamment les jeunes soldats, sont les plus fréquemment touchés. Les traumatismes crâniens, qui sont le plus généralement dus aux accidents de la circulation, aux chutes, aux activités sportives, sont associés à un fort risque d'handicap à long terme ainsi qu'à un plus fort risque mortalité que le reste de la population. Les contraintes mécaniques subies par le tissu cérébral lors de l'impact ont pour effet de tuer localement les neurones ou d'endommager les axones. De plus, une cascade complexe d'événements cellulaires incluant la formation d'œdème cérébral, l'excitotoxicité, l'apoptose et l'inflammation va venir aggraver les dommages neuronaux et axonaux.

L'exercice physique est utilisé en clinique malgré une absence de consensus concernant le délai nécessaire pour introduire ce dernier après un traumatisme crânien. Néanmoins, plusieurs études cliniques et expérimentales ont montré que l'exercice physique facilite la plasticité cérébrale ce qui favorise la récupération fonctionnelle dans diverses lésions du système nerveux central (SNC) y compris les traumatismes crâniens. Des approches pharmacologiques ont également montré des effets bénéfiques et prometteurs sur la plasticité cérébrale dans divers modèles expérimentaux de lésions aiguës du SNC.

L'objectif de ce projet est d'évaluer la combinaison d'une approche pharmacologique associée à une réhabilitation physique comme stratégie thérapeutique afin de promouvoir la plasticité cérébrale et favoriser ainsi la récupération fonctionnelle dans un modèle de traumatisme crânien chez la souris.

Le projet requiert l'utilisation de 210 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 crânien 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 crânien.

- Réduction : Notre stratégie expérimentale a été conçue minutieusement afin de réduire le nombre d'animaux sans compromettre le bon déroulement du projet : (1) suivi non invasif par IRM et suivi comportemental au cours du temps, (2) seuls les groupes contrôles-opérés strictement nécessaires seront établis, (3) création d'une banque de tissus, (4) utilisation de tests statistiques adaptés.

- Raffinement : Les méthodologies mises en œuvres sont respectueuses du bien-être des animaux et réalisées par du personnel qualifié. Les animaux seront hébergés dans un milieu enrichi. Nous serons particulièrement vigilants pour l'évaluation et la prise en charge de la douleur, pour laquelle des points limites généraux et spécifiques ont été déterminés. La prise en charge de la douleur sera assurée par l'utilisation d'un analgésique et un anti-inflammatoire non stéroïdien. Enfin, des critères d'arrêt ont été établis en cas de persistance de signes douloureux, d'infection, d'une perte de poids continue, d'une déshydratation marquée et/ou la persistance de troubles neurologiques sévères.

10125 Notre projet propose d'étudier les effets de la Relaxine-3 dans le contrôle de la sensibilisation douloureuse. Ce peptide est synthétisé dans deux régions précises du cerveau appelé Nucleus Incertus et la substance grise aqueductale (PAG) mais il est ensuite libéré dans de nombreuses aires cérébrales où il influence un grand nombre de fonctions physiologiques. Nous avons montré lors d'expériences préliminaires que la Relaxine-3 injectée dans le cerveau avait des effets analgésiques significatifs chez le rat. Nous allons maintenant nous attacher à préciser les voies nerveuses qui sont affectées par la Relaxine-3 chez des animaux contrôlés. Des animaux seront ensuite soumis à une douleur inflammatoire chronique modérée sur 4 jours, obtenue par injection intra-plantaire de l'adjuvant de Freund, un modèle d'études couramment utilisé au sein de notre équipe. Nous étudierons alors les modifications des voies nerveuses impliquées dans le rôle de la Relaxine-3, ainsi que les mécanismes de transmission de la douleur dans la moelle épinière. A l'aide d'enregistrements électrophysiologiques, nous chercherons si l'injection intracérébrale de Relaxine-3 produit un effet dans la moelle épinière qui pourrait expliquer la diminution du comportement douloureux chez la souris.

Le recours au modèle animal est indispensable car ce projet nécessite une évaluation comportementale.

Dans notre étude, la réduction du nombre d'animaux est prise en compte tout en conservant une signification scientifique statistique (hétérogénéité interindividuelle), le nombre de souris utilisé dans chacun des groupes expérimentaux ne dépassera pas ainsi 6 animaux par groupe. La réalisation de cette étude pilote nécessite l'utilisation de 144 souris.

Pour les procédures où cela est nécessaire, un antalgique sera donné. Les animaux seront surveillés quotidiennement jusqu'à la fin de l'expérimentation.

10126 Ce projet a pour objectif d'étudier l'interaction des éléments figurés du sang (plaquettes, globules rouges, leucocytes) avec la paroi artérielle selon les conditions de flux imposées lorsqu'il existe une sténose au sein d'une artère carotide, et par extension au sein d'une artère coronaire. Il n'existe pas de modèle *in vitro* permettant l'étude fiable et précise de l'athéro-thrombose *in vivo*, ici du phénomène d'érosion. C'est pourquoi nous utiliserons un modèle expérimental d'érosion endothéliale artérielle à partir d'une sténose unilatérale sur carotide de lapin.

Quarante lapins seront utilisés, répartis en deux groupes expérimentaux de 20 selon le régime suivi. Le lapin possède en effet un métabolisme lipidique particulier qui en fait un très bon modèle d'étude de l'athérosclérose. Un modèle murin n'est à ce titre pas envisageable.

Chirurgicalement, sous anesthésie générale, la mise en place d'un manchon externe préalablement conçu à partir d'une imprimante 3D péricarotidien doit mener au développement d'une sténose carotidienne artificielle. A 1 mois, les lapins seront euthanasiés sous anesthésie générale et les prélèvements effectués.

La règle des 3R sera suivie avec :

Remplacement : Il n'existe pas de modèle *in vitro* permettant l'étude fiable et précise de l'athéro-thrombose *in vivo*, ici du phénomène d'érosion. Par ailleurs, l'analyse des conséquences hémodynamiques nécessite un animal vivant.

Réduction : Nombre minimal d'animaux pour obtenir une analyse statistique significative. Ce nombre est réduit au minimum en utilisant chaque lapin comme son propre témoin (1 côté opéré, l'autre faisant office de témoin). Ce modèle a déjà été testé dans d'autres études permettant la rédaction en amont d'un protocole précis évitant toute manipulation inutile. Cependant l'érosion n'a jamais été étudiée au niveau des globules rouges par un tel modèle.

Au décours une analyse statistique permettra de comparer le phénomène de collision des globules rouges lors de l'érosion coronaire selon l'existence et la localisation d'une sténose fibreuse modérée, ainsi que selon l'existence ou non d'une hypercholestérolémie.

Raffinement :

En préopératoire, une période d'acclimatation d'au moins une semaine sera observée avant l'entrée des animaux dans le protocole.

En peropératoire : procédure d'anesthésie générale pour la chirurgie et d'analgésie en fin de procédure pour limiter la douleur.

En post-opératoire : surveillance biquotidienne les 3 premiers jours puis quotidienne y compris le week-end jusqu'à l'euthanasie avec une observation de l'état général des lapins (de la prostration, d'isolation, d'agressivité, l'anorexie, l'absence de mobilité) et des points limites bien définis. La mesure du poids est effectuée 2 fois par semaine.

Les lapins seront remis dans leurs cages à leur réveil complet de l'anesthésie. Les animaux seront hébergés sous conditions standard du laboratoire ; eau et nourriture ad libitum. La température est maintenue contrôlée entre 20 et 22°C. Rythme Veille/sommeil de 12h/12h.

L'analyse histologique et immunohistochimique sera ensuite réalisée afin d'attester la présence du phénomène d'érosion et en permettre l'étude détaillée.

10127 *Echinococcus multilocularis* est un ver parasite principalement retrouvé dans l'hémisphère nord (Europe Centrale, Alaska, Chine, Japon, etc.). Les vers adultes vivent dans les intestins des canidés, majoritairement les renards, mais également les chiens. Ces vers adultes produisent des œufs infectieux, qui sont rejetés avec les fèces des renards. Dans la nature, ces œufs peuvent être ingérés par des rongeurs, tels que les campagnols dans lesquels, le parasite atteint les intestins, traverse la barrière intestinale et se dissémine dans l'organisme pour se localiser majoritairement au niveau du foie. Le rongeur infecté peut être ingéré par un renard donnant de nouveau un ver adulte au niveau des intestins de celui-ci. L'œuf peut également être ingéré accidentellement par l'homme lors de la consommation d'aliments ou d'eau souillés par des déjections contenant des œufs infectés. La croissance et la prolifération du parasite au niveau hépatique induit alors chez l'homme une échinococcose alvéolaire (EA), qui est une pathologie chronique mettant plusieurs années à se développer. C'est la pathologie la plus létale parmi toutes les infections de l'homme par des vers. A l'heure actuelle, la seule méthode curative pour cette pathologie est la chirurgie par résection du tissu parasitaire. Cette chirurgie, possible dans seulement 30% des cas, s'accompagne d'un traitement médicamenteux pendant plusieurs années. Ces traitements sont responsables de nombreux effets secondaires (hépatotoxicité notamment) conduisant les patients à observer des pauses thérapeutiques permettant ainsi à la maladie de reprendre sa progression allant jusqu'à la destruction du foie. Devant ce manque de solution thérapeutique, la recherche de molécules efficaces est nécessaire et urgente pour traiter les personnes atteintes d'EA. La compréhension des mécanismes de défenses de l'organisme contre ce vers permettrait d'identifier de nouveaux moyens d'action pour favoriser l'élimination du ver. Notre équipe a montré l'importance d'une interleukine, l'IL-33, dans la régulation des mécanismes de défenses de l'organisme vis-à-vis de différents pathogènes. Des collaborateurs ont généré des souris déficientes pour le gène codant l'IL-33 et notre projet est de soumettre ces souris au parasite pour comprendre le rôle de ce facteur dans la maladie. Les animaux infectés par le parasite seront étudiés selon une cinétique établie. Les organes prélevés (foie et rate) seront analysés par différentes méthodes pour quantifier l'atteinte hépatique et systémique et l'avancée des processus de défense immunitaire. Les animaux seront hébergés dans une structure agréée de niveau 3 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. Le nombre de souris engagées dans ces expériences est évalué au nombre de 496, nous avons pensé ce protocole en suivant la règle des 3 R « Remplacer, Réduire, Raffiner » :

Remplacer :

Il faut noter qu'il n'existe aucun moyen de remplacer de telles études qui englobent l'ensemble de l'organisme dans sa réponse physiopathologique, et que seule l'expérimentation animale permet un suivi complet de la maladie depuis ses phases les plus précoces et permet d'étudier la réponse physiologique d'un individu déficient pour une molécule d'intérêt pour évaluer son rôle.

Réduire :

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 (foie et rate) pour ainsi récolter un maximum d'informations.

Raffiner :

Les animaux sont hébergés en groupes sociaux et bénéficient d'un enrichissement adapté. Les souris infectées seront étudiées à différents temps où les souris ne présentent encore aucun signe de maladie et ne souffrent pas.

Ce travail permettra de préciser le rôle de ILL-33 dans la mise en place et la chronicité de la maladie « EA » chez la souris. A terme, les données de ce travail pourraient permettre de développer de nouvelles stratégies de traitement.

10128 La méningite cérébro-spinale et le purpura fulminans sont des infections bactériennes sévères et d'évolution rapide, dont la mortalité approche 100 % en l'absence de prise en charge médicale. En France, le taux de mortalité reste élevé à 8% des cas (3% dans la méningite et 30 % dans le purpura fulminans) malgré l'existence de traitements. De plus, même en cas d'évolution non fatale, les séquelles sont fréquentes et graves (amputations). La bactérie responsable de ces infections a la particularité de coloniser les vaisseaux sanguins lorsqu'elle provoque une infection invasive.

Le but de ce projet est d'étudier les mécanismes de l'interaction entre la bactérie responsable de la méningite cérébro-spinale et du purpura fulminans et les vaisseaux sanguins humains afin de mieux comprendre la physiopathologie de cette maladie et de tester de nouvelles stratégies thérapeutiques. Le purpura fulminans est un syndrome infectieux très sévère, qui associe une septicémie à des lésions tissulaires nécrotiques disséminées de la peau et des organes internes. Ces infections sont donc complexes et impliquent plusieurs organes et systèmes physiologiques à l'échelle de l'organisme (cellules endothéliales, circulation sanguine, coagulation, système immunitaire, etc.). Ainsi, notre étude nécessite le recours à un modèle animal. La bactérie responsable de ces infections n'interagit qu'avec les vaisseaux sanguins humains, nous utiliserons donc une lignée de souris humanisées avec de la peau humaine (modèle mimant le purpura fulminans). Nous chercherons ainsi à valider in vivo des hypothèses physiopathologiques et des agents pharmacologiques préalablement identifiés dans des études in vitro sur cellules endothéliales.

Les souris seront greffées avec de la peau humaine. Après la prise de greffe, elles seront infectées avec la bactérie, et nous analyserons l'évolution de la bactériémie en réalisant des prélèvements sanguins. Certaines souris seront traitées avec des agents pharmacologiques empêchant la bactérie de coloniser les vaisseaux sanguins. Entre 4 et 72 heures après l'infection, les souris seront euthanasiées pour prélever le greffon et étudier les lésions tissulaires. Ce projet nécessitera l'utilisation de 510 souris.

Pour respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux utilisés sera réduit au minimum permettant de répondre aux questions scientifiques de ce projet, nous avons estimé la taille des échantillons permettant une analyse statistique efficace des résultats grâce aux données collectées au cours d'expériences précédentes. Les animaux bénéficieront d'une surveillance quotidienne durant les procédures expérimentales et les actes invasifs seront réalisés sous anesthésie générale. Afin de réduire leur souffrance et leur stress, des mesures antalgiques médicamenteuses sont prévues pour toutes les procédures douloureuses. Enfin, des points limites ont été établis. Ils entraîneront l'euthanasie anticipée de l'animal si nécessaire, pour limiter la souffrance.

Les résultats attendus de ce travail sont importants, car ils permettront de mieux comprendre les mécanismes de la méningite cérébro-spinale et du purpura fulminans. Ils pourront permettre de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques, permettant ainsi de diminuer la mortalité et les séquelles de ces infections sévères.

10129 L'obésité est la conséquence d'une balance énergétique déséquilibrée où les entrées d'énergie sont supérieures aux dépenses. L'obésité est associée au développement de l'insulino-résistance qui est elle-même à l'origine du diabète de type 2. Elle est aussi associée aux maladies cardiovasculaires et à certains cancers. Il existe trois types de tissus adipeux : le blanc, le brun et le « brite » qui correspond à un mélange entre les deux premiers, c'est-à-dire à la présence d'adipocytes bruns au sein d'adipocytes blancs. Alors que le tissu adipeux blanc est hautement adapté au stockage d'énergie, le tissu adipeux brun est capable de dissiper l'énergie sous forme de chaleur. C'est la présence dans ces cellules d'une protéine appelée « protéine découplante UCP1 » qui est responsable de cette fonction thermogénique extrêmement originale et intéressante. La

récente découverte d'adipocytes bruns fonctionnels chez l'Homme adulte permet d'envisager l'utilisation de cette fonction thermogénique pour rééquilibrer la balance énergétique. L'induction et l'activation d'adipocytes bruns et brite, permettrait ainsi de lutter contre l'obésité et ses maladies associées.

Les travaux déjà réalisés *in vitro* et *in vivo* montrent en effet que les adipocytes bruns et brites, contrairement aux adipocytes blancs, jouent un rôle bénéfique sur l'insulino-résistance et le diabète de type 2. Cette influence positive passe par la sécrétion de facteurs circulants encore mal connus qui peuvent être de nature protéique (adipokines) ou lipidique (lipokines). Ces facteurs pourraient jouer un rôle déterminant en permettant le dialogue entre les tissus adipeux et d'autres tissus comme le foie, le muscle et l'intestin entre autres.

Les résultats déjà obtenus *in vitro* suggèrent la sécrétion des molécules sécrétées par les tissus adipeux brun et brite sont sous la dépendance, au moins en partie, d'un facteur nucléaire appelé Peroxisome proliferator-activated receptor alpha ou (PPARalpha).

L'objectif de ce projet est de déterminer quel rôle joue le facteur nucléaire PPARalpha dans l'activité sécrétoire des adipocytes bruns et brites chez la souris dans un contexte d'insulino-résistance induit par un régime riche en graisses. Pour répondre à cette question, nous souhaitons utiliser des souris génétiquement modifiées chez qui l'expression de PPARalpha peut être abolie de manière spécifique uniquement dans les cellules adipeuses brunes et brites. Chez ces souris l'abolition de PPARalpha n'est pas permanente mais sera induite par l'administration de la drogue « tamoxifène ». Ces animaux nous sont donnés par un collaborateur et les expériences déjà réalisées montrent que les modifications génétiques n'induisent pas de phénotype dommageable. L'effet de la délétion de PPARalpha sera donc analysé 1) en comparant les profils de sécrétions des adipokines et lipokines des adipocytes bruns et brites ; 2) en comparant le développement de l'obésité et de l'insulino-résistance.

A l'issue de ce programme, nous espérons connaître de nouveaux médiateurs lipidiques et/ou protéiques sécrétés sous la dépendance de PPARalpha et qui jouent un rôle bénéfique sur l'insulino-résistance et le diabète de type 2. PPARalpha pourrait alors représenter une nouvelle cible thérapeutique pour lutter contre ces pathologies dont l'incidence chez l'homme est devenue un problème majeur de santé publique au niveau mondial.

Ce projet a été conçu dans le respect de la règle des 3R, i.e. remplacement, réduction et raffinement et nécessitera 608 souris réparties dans trois procédures expérimentales. Les dommages pour l'animal seront liés 1) au régime riche en graisse qui induira l'obésité et l'insulino-résistance de ces animaux ; 2) aux douleurs provoquées par les injections intra-péritonéales qui sont nécessaires à différents stades de l'expérimentation soit pour induire la délétion du gène PPARalpha (injection de tamoxifène), soit pour réaliser les tests d'insulino-résistance (injection de glucose ou d'insuline), et enfin pour stimuler l'activité des cellules adipeuses (agoniste b3 adrénergique). Au total un même animal pourra recevoir au maximum 19 injections sur une période de 16 semaines. Nous avons classé les protocoles les plus lourds en niveau de sévérité modérée.

Remplacement : Ce programme vise à découvrir les liens qui existent entre l'activité sécrétrice des tissus adipeux brun et brite et l'insulino-résistance ou le diabète de type 2. Ces processus pathologiques complexes touchent la régulation du métabolisme insulino-glucidique et impliquent de nombreux organes dont le pancréas, le foie et les muscles. Il n'existe pas pour l'instant de modèle *in vitro* qui pourrait remplacer l'expérimentation sur un organisme entier pour répondre aux questions posées ici. De plus ces expériences font suite à de nombreuses expériences menées *in vitro* sur des cellules en culture qui ont permis de cibler les hypothèses les plus pertinentes à poser *in vivo*.

Réduction : Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet a été calculé afin d'obtenir des résultats significatifs à partir d'un nombre minimum d'animaux. Nous utiliserons des groupes de 16 souris (8 mâles et 8 femelles) et 4 souris par cage. Le nombre total de souris (cf. ci-dessus) nous permettra d'obtenir en quantité suffisante tous les échantillons tissulaires nécessaires à notre étude. Ce nombre de souris nous permettra également de réaliser des études statistiques adaptées en comparant les groupes deux par deux (régime alimentaire versus suppression du gène d'intérêt, ou encore régime alimentaire versus traitement mimant l'exposition au froid). Pour cela nous utiliserons des tests non paramétriques : one-way ANOVA suivi par un post-test de type Student-Newman-

Keuls. Si nous n'observons pas de différences entre mâles et femelles, nous n'utiliserons que les mâles ou que les femelles pour la dernière procédure.

Raffinement : Toutes les expériences et manipulations des animaux seront effectuées avec le souci de préserver le bien-être de l'animal : enrichissement de l'environnement ; surveillance régulière ; suivi selon une grille d'évaluation prévoyant le recours à des points limites précoces et adaptés ; prélèvements sur animaux vigiles effectués par des personnes expérimentées ; prélèvements espacés dans le temps au maximum et volumes prélevés du minimum nécessaire.

10130 En 2004, le nombre de personnes touchées par la pathologie d'Alzheimer était de 25 millions. Du fait de l'accroissement de la durée de la vie, on estime que le seuil des 65 millions de malades sera atteint en 2030.

Les études portant sur le développement de la maladie d'Alzheimer impliquent la caractérisation du fonctionnement du système nerveux central, ce qui nécessite de mener des études chez l'animal à différents âges. Les analyses comportementales privilégient les domaines de l'apprentissage et de la mémoire, évalués chez les rongeurs au moyen de deux tests éthologiques de référence : le labyrinthe en Y et la piscine aquatique de Morris. Cependant, ce dernier test engendre des complications dues à ses modalités d'application. En effet, même si dans cette procédure l'apprentissage spatial est bien caractérisé, le stress situationnel induit par le placement de l'animal dans l'eau ainsi que la fatigue cumulée, essai après essai, sont des facteurs délétères, à la fois pour l'animal et pour l'interprétation des résultats expérimentaux, surtout chez des animaux âgés ou en surpoids, dont les capacités physiques peuvent être inadaptées à ces contraintes.

En conséquence, nous souhaitons valider un test alternatif à la piscine de Morris, évaluant identiquement la mémoire spatiale, mais dont les modalités d'utilisation seraient beaucoup moins stressantes pour les animaux. Notre choix s'est porté sur test de Barnes, dispositif constitué par un disque circulaire d'un mètre de diamètre, placé en hauteur, et percé de 44 trous. Cet espace ouvert, par nature aversif aux souris, comporte une chambre d'échappement située sous le plateau, accessible via une seule des ouvertures, dont l'animal apprend la localisation grâce à des indices spatiaux. Lors des évaluations de la mémoire spatiale, l'utilisation de ce dispositif permettra d'éviter à la fois le stress situationnel et la forte sollicitation des capacités locomotrices des animaux. Ainsi, plus éthique que la procédure de Morris, ce test de Barnes devrait être également plus sensible dans la détection des atteintes des fonctions de l'apprentissage et de la mémoire.

Ce projet porte sur la validation expérimentale de ce dispositif, dans l'objectif de nous affranchir de l'utilisation du labyrinthe aquatique de Morris.

Plusieurs groupes de souris seront nécessaires à cette étude, en particulier un groupe présentant les symptômes de la maladie d'Alzheimer, ainsi qu'un groupe soumis à une molécule à effet amnésiant. Les performances comportementales de ces animaux à l'issue de leur évaluation dans le test de Barnes seront comparées à celles de souris témoins et nous permettront de valider ou non l'utilisation d'un tel dispositif en remplacement du test de la piscine de Morris.

Ce type d'étude ne peut être réalisé que sur des animaux vivants, seul niveau d'organisation permettant d'évaluer les effets délétères ou bénéfiques de la nutrition et/ou de l'âge sur les fonctions cognitives, en particulier dans les domaines de l'apprentissage et de la mémoire (Remplacer).

Les animaux seront stabulés à 4 par cage ; les cages comprendront des éléments d'enrichissement du milieu sous la forme de papier carré végétal et de briquettes de bois. Une fois l'expérimentation terminée, les animaux seront euthanasiés, puis différents organes seront prélevés et serviront à la mise au point de méthodes biochimiques in vitro sans lien direct avec ce projet (Réduction).

L'étude sera réalisée sur 72 souris. L'effectif de 12 animaux par groupe a été fixé au minimum possible, tenant compte de la nécessité d'obtenir des données comportementales statistiquement exploitables en termes de puissance statistique (Réduire). Le bien-être des animaux sera contrôlé quotidiennement et l'inconfort évité au maximum au cours de l'expérimentation, de manière à garantir la qualité des résultats (Raffiner).

En cas de dépassement de l'un des points limites définis (signes physiologiques et comportementaux traduisant un état de douleur ou de détresse), les animaux seront euthanasiés par une surdose d'anesthésique, leur décès sera vérifié par absence de battements cardiaques.

10131 La compréhension des dérégulations métaboliques observées au cours de maladies chroniques telles que l'obésité et le diabète est un enjeu majeur de santé publique face à la progression épidémique de ces pathologies.

Le diabète se caractérise par un excès chronique de glucose dans le sang (hyperglycémie), ce qui, à long terme, peut entraîner de graves complications cardiovasculaires. L'augmentation de la glycémie chez les diabétiques résulte principalement d'une production hépatique de glucose anormalement élevée. En condition normale, cette production de glucose par le foie est finement régulée ce qui permet de maintenir une glycémie constante. La compréhension des mécanismes moléculaires qui président au contrôle de la production hépatique de glucose est fondamentale pour envisager de nouveaux traitements du diabète. Ce projet vise à caractériser de nouveaux acteurs moléculaires permettant de moduler la production hépatique de glucose et à proposer de nouvelles cibles thérapeutiques dans le but de traiter le diabète chez l'homme. Seule une approche intégrée, par utilisation de modèles murins, permet de mimer la physiologie et la pathologie humaine et d'étudier des modifications de marqueurs physiologiques comme la glycémie. Le nombre d'animaux utilisés sera de 1018 souris pour une durée de cinq ans. Dans ce projet, différentes lignées de souris génétiquement modifiées seront créées et utilisées pour mettre en évidence le rôle de ces acteurs moléculaires dans la régulation de la glycémie. Différents tests fonctionnels (comme la mesure de tolérance au glucose et de production hépatique de glucose) adaptés à l'étude de l'homéostasie glucidique seront réalisés afin de valider in vivo les cibles thérapeutiques préalablement identifiées par des études in vitro.

Notre projet met également en jeu des procédures d'induction de modèles de diabète (obtenus par une alimentation hyper-lipidique ou traitement à streptozotocine), afin de tester le potentiel thérapeutique de ces acteurs moléculaires par infection par des vecteurs viraux recombinants ou administration de substances pharmacologiques. Pour respecter le principe des 3R, des méthodes alternatives de culture cellulaire seront utilisées pour étudier les mécanismes moléculaires sous-jacents. Le nombre d'animaux utilisés sera réduit à son minimum mais suffisant pour permettre une analyse statistique efficace des résultats. De plus, afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux, ils seront hébergés en groupe avec leurs congénères dans un milieu enrichi. Les animaux seront observés quotidiennement et évalués à l'aide de points limites bien définis, entraînant l'euthanasie anticipée de l'animal si nécessaire. Ce projet devrait apporter des données importantes sur la régulation de la production hépatique de glucose, et mettre en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques afin de rééquilibrer une production anormale de glucose et de rétablir une glycémie normalisée.

10132 Le diabète de type 1 (ou insulino-dépendant) est une maladie auto-immune résultant de la destruction sélective des cellules du pancréas, productrices d'insuline, par le système immunitaire, en particulier les lymphocytes T. Le traitement conventionnel consiste en des injections quotidiennes d'insuline, il est contraignant et palliatif et n'empêche pas la survenue de complications dégénératives importantes (neuropathies, néphropathies, rétinopathies). Notre objectif est d'étudier l'effet thérapeutique de différentes stratégies visant à inhiber les lymphocytes T pathogènes et ainsi prévenir ou guérir la maladie. Notre étude bénéficie de l'existence d'un bon modèle animal, la souris « non-obese diabetic » (NOD) qui développe spontanément le diabète de type 1 de manière très similaire à l'homme. Grâce à ce modèle, nous pouvons analyser les mécanismes physiopathologiques en action au niveau du tissu cible, c'est-à-dire le pancréas et comprendre l'impact des immunothérapies que nous souhaitons tester.

Nous appliquerons les traitements à différents moments de la progression du diabète (c'est-à-dire chez la souris jeune pré-diabétique ou âgée diabétique) afin d'évaluer l'effet « préventif » ou « curatif » des produits. Le succès de la thérapie choisie sera déterminé par des mesures de glycosurie et/ou glycémie plusieurs fois par semaine. Les souris traitées seront suivies jusqu'à ce qu'elles atteignent 35 semaines d'âge pour obtenir une incidence fiable de la maladie. Les souris non diabétiques seront alors considérées comme protégées du diabète. On détermine ainsi l'efficacité des traitements proposés. Les souris devenant diabétiques seront euthanasiées. L'évaluation de l'effet thérapeutique des stratégies envisagées nécessitera également d'effectuer des greffes d'îlots pancréatiques sous la capsule rénale des souris traitées, ce qui permet la

restauration d'une insulino-sécrétion endogène et donc la normalisation de leurs taux de glycémie. Cette chirurgie sera réalisée sous anesthésie générale et des traitements analgésiques pré et post-opératoires seront effectués pour contenir la douleur liée au geste chirurgical.

Au total, nous estimons à 1236 le nombre de souris nécessaires à ce projet. Afin de respecter la règle des 3R, des expériences in vitro compléteront les manipulations in vivo afin de mieux comprendre le mode d'action des produits utilisés. De plus, le nombre de souris utilisées par expérience sera réduit au minimum permettant de déterminer de manière fiable, robuste et statistique l'effet thérapeutique des approches proposées. Une attention particulière sera portée au bien-être animal par le respect des conditions d'hébergement en accord avec la réglementation et par un suivi pluri-hebdomadaire des souris basé sur des points limites définis, entraînant si nécessaire, l'euthanasie anticipée de l'animal.

A terme, les résultats de ce projet permettront d'établir le potentiel thérapeutique de médicaments qui pourraient être appliqués en clinique pour le traitement des patients diabétiques.

10133 Le traitement chirurgical conventionnel d'une lésion passe classiquement par une ouverture cutanée, qui, en dehors du préjudice esthétique, peut être source de complications (dévascularisation, infection, durée d'hospitalisation, risque anesthésique).

Une des alternatives est la mise en œuvre de techniques percutanées, qui, à l'heure de la chirurgie mini-invasive, sont en plein essor.

Les techniques et équipements modernes de chirurgie percutanée permettent d'intervenir dans la plupart des organes avec l'aide de l'imagerie médicale. Ces approches sont applicables à de nombreuses situations cliniques pour un large éventail de traitements : ablation tumorale, chimiothérapie ciblée, biopsie, drainage, procédures vasculaires telles que l'angioplastie et le stenting (pose de prothèses).

Les avantages sont liés à la très faible invasivité de l'approche (temps de récupération courts, possibilité d'éviter une anesthésie générale), apportant un réel bénéfice dans la réhabilitation post opératoire du patient, mais aussi un bénéfice médico-économique.

Cependant, des complications peuvent survenir car les procédures sont souvent difficiles, encore peu utilisées et divers aspects anatomiques et techniques (imagerie) doivent être maîtrisés. Les praticiens doivent se former à l'utilisation de nouveaux équipements et à la réalisation des procédures en elles-mêmes.

Il est alors nécessaire de les valider sur un modèle animal vivant avant de les mettre en pratique chez le patient.

Le but de ce protocole est donc de tester sur modèle porc de nouveaux traitements par chirurgie percutanée pour en démontrer l'efficacité et la sécurité :

L'ensemble des procédures de ce projet de recherche et d'innovation se limitera au système digestif et à ses annexes (foie, vésicule biliaire, pancréas).

200 animaux seront utilisés dans le respect de la règle des 3 R :

Remplacement : En chirurgie, les méthodes alternatives permettant de mimer la situation clinique ne sont pas toujours suffisantes pour permettre au praticien d'opérer ses patients en toute sécurité et avec le taux de réussite optimal (durée d'intervention, efficacité du geste). Après des phases préalables sur simulateurs et modèles ex vivo pour maîtriser certains gestes pratiques et tester de nouveaux équipements, il est nécessaire d'intervenir sur organisme entier vivant. Les procédures complexes sont ainsi reproduites de façon réaliste, en prenant en compte les situations difficiles (hémorragie, nécrose, viabilité des organes, complications).

Réduction :

Le nombre d'animaux a été réduit au maximum afin d'obtenir des résultats statistiquement exploitables permettant d'envisager une application chez l'homme. Un maximum de 25 animaux sera utilisé par procédure pour valider un modèle ou une approche innovante.

Raffinement :

Le protocole prévoit des procédures mini-invasives réalisées sous anesthésie générale. La moitié des animaux seront soumis à des procédures sans réveil.

Les autres animaux en soins post opératoire seront soumis à une évaluation clinique quotidienne par du personnel qualifié, ils seront sous couverture antalgique, dans un environnement enrichi.

Toute altération de leur l'état général sera reportée au vétérinaire et au responsable de l'intervention chirurgicale qui mettront en œuvre des traitements adaptés. Des critères d'arrêt anticipé en cas de survenue de complication ont été définis.

10134 L'oxaliplatine est le traitement de référence pour les cancers gastriques en particulier le cancer colorectal. Cependant, ce traitement induit des effets secondaires qui se caractérisent par une atteinte des nerfs sensitifs chez 70% des patients. L'oxaliplatine induit tout d'abord des effets secondaires aigus tels qu'une sensibilité au froid, qui peuvent évoluer vers une pathologie chronique dans 15 à 20% des cas. Ces effets secondaires apparaissent dès le début du traitement et peuvent persister plusieurs jours. La sévérité des symptômes augmente avec la répétition du traitement et l'augmentation des doses. Ces effets secondaires sont souvent si importants qu'ils obligent le praticien à stopper le traitement ce qui a de lourdes conséquences sur le pronostic du patient. Il est donc urgent de trouver une solution pour minimiser les effets secondaires de l'oxaliplatine qui reste le seul traitement efficace pour ce type de cancer. Les mécanismes moléculaires responsables de ces effets secondaires induits par le traitement à l'oxaliplatine sont encore très mal connus. Notre projet consiste à rechercher les modifications d'expression des gènes qui s'opèrent dans les neurones responsables de la nociception pour identifier les mécanismes impliqués et trouver de nouvelles cibles thérapeutiques. Nous étudierons en particulier le rôle de petites molécules régulatrices appelées miRNAs. Nous avons adapté un modèle préalablement décrit dans la littérature basée sur l'injection intrapéritonéale d'oxaliplatine chez des souris males C57BL6J. Celui-ci consiste en une injection unique d'oxaliplatine à la dose de 6mg/kg. Les animaux seront testés pour évaluer les comportements moteurs et sensoriels puis seront euthanasiés pour mesurer le niveau d'expression des gènes cibles dans les nerfs sensitifs, les ganglions rachidiens postérieurs et la moelle épinière. Le recours au modèle animal est indispensable car ce projet nécessite une évaluation comportementale et aucun modèle in vitro (cellules ou tissus) ne peut reproduire les conditions de la pathologie étudiée. Dans notre étude, la réduction du nombre d'animaux est prise en compte tout en conservant une signification scientifique statistique (hétérogénéité interindividuelle), le nombre de souris utilisé dans chacun des groupes expérimentaux ne dépassera pas ainsi 10 animaux par groupe. La réalisation de ce projet dans son ensemble nécessite l'utilisation de 300 souris. Dans toutes les procédures où cela sera possible, un antalgique sera donné et tous les animaux feront l'objet d'une surveillance quotidienne renforcée, et les points limites définis permettront de veiller au bien-être animal et maîtriser toute souffrance.

10135 Notre projet de recherche a pour thématique les complications cardiovasculaires du sujet diabétique. Nous étudions en particulier le rôle des plaquettes sanguines dans la thrombose, qui est la formation d'un caillot dans une artère provoquant l'arrêt du flux sanguin. En effet, l'activité des plaquettes des patients diabétiques est modifiée et augmente le risque de thrombose. Notre équipe a mis en évidence une augmentation de la stéfine A dans les cellules formant des plaquettes de souris obèses et diabétiques. Lors du diabète, des niveaux élevés de glycémie peuvent, au fil du temps, conduire à une mauvaise circulation sanguine. Ce qui va entraîner une mauvaise cicatrisation des plaies. Les plaquettes jouent également un rôle dans la cicatrisation. Les enzymes sur lesquelles agit la stéfine A sont retrouvées au niveau des cicatrices. La stéfine A, libérée par les plaquettes, pourrait donc jouer un rôle dans la cicatrisation.

Les objectifs de notre travail sont 1) d'étudier l'effet de la modulation de la stéfine A dans la thrombose artérielle et 2) d'étudier l'effet de la cystatine A humaine (équivalent de la stéfine A chez l'homme) dans la cicatrisation.

Nous avons déjà étudié l'effet de la stéfine A dans un modèle cellulaire in vitro (adhésion des plaquettes à une matrice synthétique en conditions de flux) mais cette technique ne fait pas intervenir toutes les cellules et les molécules présentes dans le sang. Nous utilisons la souris comme modèle d'études, car plusieurs modèles de thrombose sont bien décrits et parfaitement maîtrisés par les expérimentateurs. De plus, nous utilisons une technique originale pour augmenter les taux circulants de stéfine A, qui est validée uniquement chez la souris : l'injection hydrodynamique.

Nous utiliserons un modèle de thrombose artérielle mésentérique avec blessure au chlorure de fer et nous suivrons la formation du caillot dans les vaisseaux par vidéo-microscopie chez la souris anesthésiée durant toute la procédure. Nous utiliserons un modèle de plaies sur rongeurs, décrit dans la littérature, représentatif de la pathologie humaine avec ses composantes vasculaires et neurologiques. Aucune méthode alternative ne permet actuellement de reproduire ce modèle. Il est donc indispensable de recourir à l'animal entier.

Remplacer : Dans la mesure du possible, les expériences in vivo sur souris seront remplacées par des études in vitro sur cellules.

Réduire : Nous utiliserons le nombre d'animaux strictement nécessaire pour obtenir des résultats statistiques fiables (détermination des effectifs). Le nombre d'animaux nécessaires tient aussi compte de l'expérience des expérimentateurs qui leur a permis d'évaluer la mortalité et l'efficacité de la technique.

Un total de 147 souris sera utilisé dans ce projet : 112 pour les modèles de thrombose et 35 dans le modèle de cicatrisation.

Raffiner : Afin de limiter l'angoisse, l'inconfort, le stress et la douleur associés, les expériences sont raffinées. Le modèle de cicatrisation nécessite la réalisation de deux blessures cutanées dans le dos de la souris ; les souris seront anesthésiées durant la procédure et bénéficieront de l'injection d'un traitement analgésique adapté. Après la procédure, les souris seront hébergées en cage individuelle afin de ne pas aggraver les blessures expérimentales et d'arracher les sutures. Les animaux seront surveillés plusieurs fois par jour afin d'évaluer les signes de souffrance et de détresse et ainsi respecter les points limites que nous avons fixés.

L'établissement d'expérimentation a mis en place un enrichissement du milieu.

10136 Le but de ce projet est l'évaluation de l'effet thérapeutique des acteurs du cycle de recyclage du nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) sur la progression de la cardiomyopathie dans le cadre de la dystrophie musculaire liée à des mutations dans deux gènes codant des protéines de l'enveloppe nucléaire.

L'espèce animale utilisée pour ce projet est la souris *Mus musculus*. En effet, Afin d'étudier la physiopathologie de cette pathologie nous avons créé un modèle murin par transgénèse ciblée porteur d'une mutation décrite chez l'homme. Ce modèle murin récapitule à l'état homozygote les caractéristiques phénotypiques de cette pathologie ; atteintes des muscles squelettique et cardiaque. Les premiers symptômes sont détectés dès 3 mois chez les mâles homozygotes et évoluent rapidement jusqu'au décès des animaux provoqué principalement par l'aggravation du phénotype cardiaque. Par conséquent ce modèle constitue le modèle de référence pour tester l'administration de nicotinamide riboside afin de déterminer ces effets thérapeutiques sur la progression du phénotype cardiaque et musculaire dans le contexte de cette pathologie.

Le nombre d'animaux inclus dans ce protocole est 96. Le plan expérimental est déterminé à l'aide du module IPSUR du logiciel R. Ce modèle permet de déterminer le nombre minimum d'animaux à inclure dans l'expérimentation tout en ayant suffisamment de données expérimentales pour appliquer les tests statistiques nécessaires à l'analyse des données.

La méthode d'évaluation de l'effet thérapeutique sur la fonction cardiaque est non invasive et nécessite uniquement une anesthésie légère. L'évaluation de l'effet thérapeutique sur la fonction sur le muscle squelettique est non invasive mais nécessite néanmoins un protocole qui engendre chez l'animal une demande d'effort physique sous la contrainte de l'expérimentateur.

Le milieu est enrichi avec du coton compacté en formats prédécoupés de dimensions 50 x 50 mm pour la nidification des souris. Des igloos (maisonnettes) en polypropylène sont disposés dans les cages permettant les jeux et le repos des souris.

10137 Les migraines constituent un problème de santé publique ayant un impact négatif majeur dans la vie quotidienne des patients. Les crises de migraine qui concernent 20% des femmes pour 6% d'hommes, sont caractérisées par des céphalées d'intensité modérée ou sévère, unilatérales, pulsatiles, pouvant durer entre 4 et 72 heures en l'absence de traitement. Ces céphalées sont associées à des modifications de la perception sensorielle telles que l'allodynie (douleur provoquée par une stimulation non douloureuse), la phonophobie et/ou la photophobie. Ainsi la

physiopathologie de la migraine implique des régions cérébrales multiples pour rendre compte à la fois de la douleur et des troubles sensoriels associés. L'étude des mécanismes physiopathologiques nécessite donc d'avoir recours à l'animal afin de tenir compte de toutes les interactions cérébrales qui entrent en jeu lors d'une crise migraineuse.

Dans ce projet, nous nous intéresserons à l'apparition et à l'aggravation de la phonophobie lors des crises de migraine qui se répètent. La phonophobie peut être mesurée à l'aide de la mesure du sursaut du rat lors de l'émission d'un son. Par ailleurs les modifications de l'intégration du son par les voies auditives seront évaluées en utilisant des méthodes objectives, basées sur l'enregistrement de l'activité électrique de divers relais de la voie auditive. Nous enregistrerons l'activité électrique des différents relais des voies nerveuses auditives en mesurant les potentiels évoqués auditifs après plusieurs fréquences différentes de son comme stimulation.

Pour respecter la règle des 3R, 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.

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. Le nombre d'animaux dans cette étude tient 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 50 rats seront utilisés dans ce projet, 20 dans le cadre de l'étude du sursaut et 30 dans le cadre des tests fonctionnels.

D'après les études précédentes, notre modèle animal n'entraîne pas de dommages tissulaires. Les dommages attendus, mis en évidence précédemment, sont une douleur céphalique générée lors de l'injection de substances inflammatoires à la surface des méninges pour modéliser la crise de migraine. Les tests fonctionnels auditifs seront effectués sur l'animal anesthésié. Ils seront euthanasiés à la fin des procédures par overdose d'anesthésique.

10138 Lors de la greffe d'îlots chez des patients diabétiques de type 1 (DT1), la forte réaction immunitaire induite nécessite un traitement antirejet onéreux aux effets secondaires lourds. Une alternative à ce type de traitement est l'encapsulation d'îlots dans un bio polymère poreux (alginate) qui permet le passage des nutriments et de l'insuline générée mais échappe au système immunitaire. D'un point de vue compréhension fine et capacité de criblage d'activité pharmacologique il est primordial d'être capable de réaliser un étalon in vitro de la fonction endocrine. Ce projet repose sur le principe d'« organe sur puce » mimant in vitro une fonctionnalité biologique aussi complète que possible.

Depuis 2010-2012 nous observons un envol sur la thématique coté publications. Les Etats-Unis avec leur initiative « human on a chip », ont été précurseurs (2012) en allant plus loin dans la démarche avec une construction in vitro de plusieurs fonctions interagissant ensemble pour mimer au mieux des conditions physiologiques.

Dans ce domaine, une limite majeure concerne la survie des îlots pancréatiques, et des études démontrent l'importance de la vascularisation. Dans ce projet, nous envisageons d'utiliser des îlots pancréatiques et des cellules endothéliales pour la néo-vascularisation au sein de ce futur dispositif sur puce. Nous devons donc passer par des étapes expérimentales pour comprendre les interactions entre ces deux types cellulaires. Le but est de trouver les conditions physiologiques optimales au bon fonctionnement et à la survie des deux types cellulaires. Pour ce faire, nous allons déterminer le milieu de culture à utiliser conjointement, le meilleur ratio de cellules endothéliales et d'îlots pancréatique, et évaluer l'effet d'un contact direct et/ou indirect et du milieu conditionné par les cellules endothéliales pour structurer au mieux le futur dispositif.

Dans un souci de respect de la règle des 3R, nous avons :

Remplacé : les lignées de cellules pancréatiques (Min6 ou INS1) sont des cellules bien plus résistantes que les cellules pancréatiques humaines ou de rat. De plus, la disponibilité en îlots humains, dépendante du don d'organe à usage scientifique, est extrêmement limitée. Les îlots de

rats représentent une alternative à l'utilisation des îlots humains pour la validation in vitro du projet et justifie l'utilisation des animaux dans le projet.

Réduit au minimum le nombre d'animaux nécessaire pour atteindre la puissance statistique. La validation in vitro du dispositif justifie l'utilisation de 50 animaux dans le projet.

Raffiné en améliorant l'hébergement des animaux avec milieu de vie enrichi, observation quotidienne par l'équipe responsable de l'animalerie (comportement, aspect, détection de toute souffrance).

10139 Lorsque nous sentons une odeur, notre première réaction est, j'aime où je n'aime pas. Cette réaction est un reflet de ce que l'on appelle la valeur hédonique de l'odeur qui guide notre comportement d'approche ou de retrait. Cette dimension hédonique des odeurs est un paramètre dominant de la perception olfactive et les mécanismes neuronaux qui la sous-tendent sont mal connus. Cette dimension hédonique des odeurs s'altère au cours du vieillissement, conduisant à des troubles de la prise alimentaire et de l'humeur eux-mêmes participant à une forte dégradation de la qualité de vie. De plus, il est bien établi chez l'homme que la valeur hédonique des odeurs est profondément influencée par la culture et l'expérience. Cette modification par l'expérience de la valeur hédonique de l'odeur est modélisable chez l'animal grâce à des protocoles comportementaux associatifs classiques.

Ainsi, il va s'agir dans un premier temps de déterminer la signature neurale de la valeur hédonique des odeurs chez l'animal jeune et âgé, de façon innée mais également après apprentissage.

De plus, les deux hémisphères du cerveau ne fonctionnent pas de façon complètement similaire. En effet, de nombreuses études ont montré que certaines fonctions cérébrales comme le langage par exemple étaient latéralisées. Nous proposons de tirer parti du comportement olfactif chez les rongeurs pour évaluer si le message olfactif et plus particulièrement la valeur hédonique est traitée de manière latéralisée.

Enfin, les odeurs à valeur hédonique positive et donc plaisantes pourraient participer plus largement à la genèse d'émotions positives via des connexions avec les structures cérébrales spécialisées dans les émotions, et pourraient ainsi diminuer l'anxiété. Nous analyserons l'effet de la diffusion d'odeurs sur le niveau d'anxiété des souris grâce à des tests comportementaux standard.

D'un point de vue fondamental, ces résultats apporteront des éléments déterminants pour la compréhension des mécanismes de codage de la valeur hédonique de l'odeur et de ses modulations par l'âge ou l'expérience. Il s'agit d'un pan entier de la physiologie olfactive dont les processus fondamentaux restent très méconnus. Ce travail, d'un point de vue plus appliqué, devrait fournir de nouvelles pistes thérapeutiques pour promouvoir le bien-être par les odeurs. Ainsi, ce projet permet d'envisager des bénéfices fondamentaux et cliniques évidents.

L'étude des processus physiologiques et plus particulièrement l'étude des bases neuronales du comportement nécessite l'utilisation d'animaux vivants et ne peut s'envisager sur modèles strictement in vitro. La très grande majorité des études sur les bases neurales de la perception olfactive a été menée chez la souris C57Bl6J adulte. C'est donc sur ce même modèle que notre projet sera mené. 1205 souris sur une période de 5 ans seront nécessaires à ce projet. La signature neurale de la valeur hédonique, les effets de l'apprentissage et de l'âge sur les structures nerveuses sont étudiés principalement post mortem à l'échelle cellulaire et moléculaire. Nous modulerons également l'activité des circuits neuronaux pendant le comportement de l'animal. Nous resterons très attentifs au bien-être animal et une surveillance accrue (mesure du poids, administration d'antalgique, observation de l'animal.) sera effectuée lors des privations alimentaires et des chirurgies.

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

- » Remplacer » les modèles animaux : Notre projet se focalise sur un modèle expérimental nécessitant l'utilisation d'un modèle animal. 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 et suffisant d'animaux, pour garder une puissance statistique dans le traitement des résultats. De plus, afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés, nous

corrélons (grâce à des statistiques adaptées) le comportement et les paramètres cellulaires sur les mêmes animaux et poursuivrons le développement d'un modèle bio-informatique.

- » Raffiner » les animaux feront l'objet d'une surveillance rapprochée afin de détecter les points limites de souffrance. Toutes les manipulations le nécessitant seront réalisées sous anesthésie générale et locale et des traitements préventifs (antalgiques) seront utilisés afin de réduire les risques de douleur. Le poids et l'apparence physique des souris seront vérifiés pendant toute la durée du protocole. Une perte de poids supérieure à 20% ou un signe révélateur de souffrances engendrera une euthanasie. Le comportement et la posture des souris seront également observés afin d'évaluer le degré de bien-être ou de douleur.

10140 Notre société développe et propose des modèles de recherche, adaptés aux études visant à mesurer l'efficacité et l'innocuité de candidats thérapeutiques et vaccinaux. La réponse du système immunitaire est une composante importante de notre organisme à considérer dans le développement de nouveaux vaccins ou de nouveaux composés pharmacologiques, en particulier d'origine biotechnologique.

Ce programme de recherche s'intéresse à mieux caractériser cette composante chez le rongeur, et plus particulièrement l'immunogénicité de nouvelles formulations ou composés (adjuvants, vaccins, protéines thérapeutiques, etc.). Pour cela, un composé induisant potentiellement une réponse immune sera injecté aux animaux. Afin d'évaluer et de caractériser cette réponse immune, des prélèvements, sanguins notamment, seront ensuite réalisés tout au long de l'étude afin de suivre, par exemple, l'émergence d'anticorps dirigés contre l'antigène injecté dans le sérum, ou l'activation cellulaire associée spécifiquement au composé d'intérêt. Dans le cadre d'une évaluation d'efficacité d'un composé vaccinal, un agent infectieux n'induisant pas de pathologie chez le rongeur pourra également être administré aux animaux.

Toutes les procédures techniques sur les animaux seront réalisées selon les standards validés par la structure chargée du bien-être animal (fréquence de prélèvements de sang, les méthodes d'administration des composés, etc.). Tout au long des études menées dans le cadre de ce programme, les experts dont le vétérinaire analyseront les conséquences des procédures sur le bien-être des animaux, la validité des résultats scientifiques obtenus, et chercheront à améliorer, si nécessaire, les points limites, la stratégie du suivi clinique et les procédures.

Remplacement : Des modèles in vitro permettent d'étudier certains processus de l'immunité et sont utilisés pour présélectionner les composés les plus intéressants mais aucun ne reproduit la complexité observée in vivo. C'est pourquoi l'évaluation chez l'animal des propriétés immunogènes des candidats médicaments chimiques ou biologiques est nécessaire, pour sélectionner le meilleur composé pouvant être progressé dans les études cliniques chez l'homme.

Réduction : Le nombre d'animaux utilisés est le plus faible possible en fonction des objectifs de l'étude et de la puissance statistique nécessaire. Entre 3 et 50 animaux seront inclus par groupe. Seuls des rats et souris seront utilisés dans le cadre de ce projet. Ces espèces sont utilisées pour tester les effets de composés sur le système immunitaire. Environ 10 000 animaux sur 5 ans seront inclus dans ce projet, correspondant à environ 8 études par an.

Raffinement : Les prélèvements sanguins sont de faibles volumes seront réalisés à l'aide de la méthode la moins invasive possible. Les volumes et fréquences d'administration et de prélèvement sont conformes aux bonnes pratiques et toutes les techniques sont réalisées par du personnel formé et compétent. Enfin, les prélèvements d'organes/tissus sont réalisés après euthanasie ou sous anesthésie profonde au terme de laquelle l'animal ne reprend pas conscience. Dans tous les cas, les animaux sont observés régulièrement et des mesures sont mises en œuvre pour arrêter, minimiser ou diminuer la souffrance et/ ou détresse de l'animal en cas d'apparition de signe clinique indésirable.

10141 L'obésité, étant associée à de nombreuses pathologies graves (diabète de type II, atteintes vasculaires, hypertension, maladies neurodégénératives, certains cancers), constitue sans conteste un des principaux challenges de santé publique du XXIème siècle. Une consommation excessive d'aliments riches en graisses explique, en partie, ce phénomène.

Des travaux récents indiquent qu'il existe une diminution de la détection orosensorielle des lipides alimentaires chez la souris rendue obèse par un régime hyper gras. Cette altération est liée à une dérégulation du système de détection des lipides au niveau des papilles gustatives. Ce changement s'accompagne d'une modification du comportement alimentaire se traduisant par une consommation préférentielle d'aliments riches en graisses.

A ce jour les mécanismes moléculaires responsables de cette dérégulation du « goût du gras » ne sont pas connus. Un des métabolites clés est impacté lors du développement de l'obésité : l'acide indoléacétique (IAA), donc la concentration diminue fortement. Des travaux récents d'autres équipes ont montré des effets bénéfiques, d'une supplémentation en IAA, sur certains aspects de l'obésité (Tolérance à l'insuline, inflammation).

Nous proposons ici l'étude de l'impact d'une supplémentation en IAA sur l'altération de la détection gustative des graisses et ses conséquences sur les choix alimentaires et la santé. Ce projet, qui fait appel à de tests de comportement alimentaire ne pouvant pas être réalisés in vitro, nécessitera l'utilisation de 30 souris. Les animaux seront divisés en 2 groupes et seront tous soumis à un régime obésogène riche en graisses saturées. Un des groupes se verra supplémenté en IAA dans l'eau de boisson. Au bout de 4 semaines de régime, les animaux participeront à des tests de comportement alimentaire de sorte de déterminer si leur capacité à détecter les nutriments a été altérée par le régime et/ou le traitement. La durée totale d'expérimentation par animal sera de 6 semaines et la durée totale du projet scientifique sera de 1 an.

Ce projet est en adéquation avec la règle des 3R :

Le Remplacement n'est pas envisageable car ce projet a pour objectifs de réaliser une étude comportementale et de physiologie du goût, rendant indispensable l'usage du modèle animal.

Le nombre d'animaux a été réduit au minimum. Au total, 36 souris seront utilisées pour garantir une analyse statistique fiable.

Le Raffinement sera garanti par l'hébergement des souris dans des conditions optimales (groupes de 3) avec de l'enrichissement (frisottis de carton et buchette de bois à ronger) et ainsi qu'un suivi quotidien de leur état général. Des points limites ont été identifiés et tout animal présentant une dégradation de son état général au-delà de ces points limites sera retiré de l'étude. De plus, un nombre restreint de personnes interviendra afin de limiter le stress des animaux.

10142 En France, le cancer colorectal se situe au troisième rang des cancers les plus fréquents : le deuxième chez les femmes et le troisième chez les hommes. Il survient en grande majorité chez les personnes âgées de 50 ans et plus. Selon les estimations, le nombre de cancers colorectaux devrait augmenter dans les prochaines années pour atteindre 45 000 nouveaux cas annuels en 2020. Malgré le nombre croissant de molécules thérapeutiques, les progrès thérapeutiques restent modestes. L'un des principaux obstacles est inhérent à l'absence d'une délivrance spécifique des médicaments dans le tissu tumoral. En outre, la majorité des substances thérapeutiques engendrent des effets secondaires liés à des effets toxiques au niveau des tissus sains. Une autre limitation importante est la présence de barrières biologiques (par exemple, la barrière endothéliale) qui limitent l'extravasation de molécules thérapeutiques en doses suffisantes vers le tissu cible.

De nouvelles méthodes basées sur l'utilisation combinée de microbulles de gaz et d'ultrasons fournissent des alternatives thérapeutiques sans précédent pour obtenir une action thérapeutique locale, efficace et non-invasive. En effet, l'activation de ces microbulles par ultrasons à proximité de la barrière hémato-tumorale, augmente transitoirement leur perméabilité et permet ainsi le passage et la pénétration de molécules thérapeutiques dans les tissus pathologiques. Grâce à ce passage augmenté, la biodisponibilité de ces molécules dans les zones cibles se trouve amplifiée, élément majeur pour une meilleure efficacité thérapeutique. Dans ce contexte, les objectifs sont d'optimiser les paramètres acoustiques permettant la délivrance ciblée d'un gène médicament. Les effets thérapeutiques de ces thérapies sur la croissance et la perfusion tumorale seront évalués sur un modèle murin de cancer colorectal sous-cutané et métastatique dans le foie par imagerie ultrasonore.

La prise en compte de la règle des 3R se décline par :

Remplacement : Dans une première approche expérimentale, nous avons réalisé des expériences in vitro dont les résultats sont particulièrement encourageants et nécessitent d'être validés avec un

modèle préclinique. Par conséquent, à cette étape du projet, le modèle animal ne peut être substitué par un autre modèle d'étude in vitro ou in silico.

Réduction : Sur la base de nos études antérieures, notre étude nécessite 270 souris. Les groupes contrôles et expérimentaux seront constitués de 10 souris. Nous réaliserons une étude statistique pour déterminer si ces différentes thérapies permettent une diminution significative de la croissance tumorale (voire une éradication de la tumeur) et une augmentation de la survie des animaux.

Raffinement : Les souris seront hébergées par groupe de 10 en présence d'un objet d'enrichissement (morceaux de carton). Les animaux seront observés une fois par jour afin d'évaluer leur stress/leur douleur après les différentes procédures réalisées sous anesthésie. La douleur sera prise en charge par une analgésie adaptée.

10143 La cowdriose est une maladie des ruminants transmise par les tiques du genre *Amblyomma*. Elle est présente sur toute l'Afrique sub-saharienne et en Guadeloupe et Antigua. Elle a un impact économique fort avec une forte mortalité sur les petits ruminants, les chèvres et moutons étant beaucoup plus sensibles à la maladie que les bovins. En Afrique, les communautés les plus touchées par la perte de production dans les petits élevages sont les femmes et les enfants qui sont détenteurs de moutons et chèvres.

Afin d'améliorer le contrôle de la cowdriose, plusieurs vaccins expérimentaux ont été développés dont le vaccin inactivé qui semble le plus prometteur. Les objectifs du projet sont l'évaluation d'un vaccin multivalent intégrant plusieurs souches de la bactérie causant la maladie, en limitant le nombre d'injection (une au lieu de) par rapport au vaccin conventionnel, et en testant un adjuvant de nouvelle génération. Cette démarche devrait permettre de couvrir la diversité antigénique des souches et de rendre ainsi le vaccin inactivé plus efficace sur le terrain. Une fois les conditions d'utilisation du vaccin multivalent précisées (une seule injection à la dose optimale) grâce aux essais en conditions contrôlées, il sera ensuite testé sur le terrain au Burkina Faso et au Kenya, voir même en Afrique du Sud. Les analyses réalisées lors des essais vaccinaux notamment sur la réponse immunitaire devraient permettre d'identifier des biomarqueurs de vaccination ou de protection qui seront essentiels pour limiter les interventions sur les animaux vaccinés lors des campagnes de vaccination ou les essais expérimentaux futurs.

Deux types d'expérience seront réalisés en conditions contrôlées : un test de vaccination avec une souche vaccinale unique émulsionnée avec le nouvel adjuvant et administré en une ou deux injections.

Dans un deuxième temps, une deuxième expérience consistera à évaluer l'efficacité d'un vaccin contenant quatre souches de géotypes différents dans les conditions fixées lors de la première expérience (nombre d'injection et dose vaccinale).

Il n'existe pas de moyen alternatif pour évaluer l'efficacité vaccinale, notamment, il n'existe jusqu'à présent aucun test ou marqueurs biologique de prédiction de la vaccination ou de la protection. D'autre part, l'utilisation du modèle souris pour faire des essais de vaccination ne sont pas possibles car les résultats obtenus sur modèle souris ne sont pas transposables au modèle ruminant pour cette maladie.

Ces essais seront effectués sur 51 chèvres qui n'ont jamais été en contact avec la maladie (naïves). Nous avons limité le nombre de chèvres utilisées pour ces expériences à 5 par groupe. Il n'est pas possible de diminuer plus le nombre d'animaux car il existe une variabilité importante entre individus et dont il faut tenir compte dans l'étude de l'efficacité du vaccin. L'utilisation de doses calibrées pour infecter les animaux permet aussi de réduire le nombre d'animaux du groupe contrôle lors de la deuxième expérience (3 animaux par souche utilisée). Etant donné que l'effet lors de l'infection est conséquent et que la morbidité sur les animaux est de 80 à 100%, il n'est pas nécessaire d'avoir un grand nombre d'animaux pour démontrer un effet de la vaccination sur les animaux.

Les chèvres utilisées seront en bonne santé avant l'expérimentation, maintenues en conditions d'élevage hors sol et elles seront suivies de manière journalière avant et pendant leur mise en expérimentation pour évaluer tout signe d'inconfort qu'elles pourraient avoir. Lors de la vaccination, les chèvres pourront avoir une légère douleur avec le développement d'une induration au niveau de la piqûre mais cette douleur et induration devraient être limitées à 24h par l'utilisation des nouveaux adjuvants contenus dans le vaccin. La douleur induite est estimée inférieure à celle d'une

injection avec aiguille pratiquée par un vétérinaire et ne nécessite pas l'administration supplémentaire d'antidouleurs. Il n'y a pas d'autres effets secondaires associés à la vaccination. Les groupes contrôles non vaccinés seront affectés par la maladie mais traités aux antibiotiques pour éviter toute mortalité. Les animaux vaccinés et infectés vont aussi développer des signes cliniques importants, mais ne devraient mourir. Il a été montré pour le vaccin conventionnel contenant l'antigène Gardel et l'adjuvant ISA70 ou ISA70M (35µg d'antigène et 2 injections), une protection de 80 à 100% pour les animaux vaccinés. Les animaux ayant 3 jours consécutifs de fièvre seront traités aux antibiotiques.

10144 La polyarthrite rhumatoïde (PR) est une pathologie très fréquente et invalidante qui représente un enjeu de santé publique. Cette pathologie auto-immune induit une inflammation chronique des articulations conduisant à la destruction des os et du cartilage, pouvant aboutir à des déformations irréversibles des articulations. Malgré les importants progrès thérapeutiques accomplis ces dernières années dans la prise en charge de la PR, notamment avec les biothérapies, environ 20% des patients atteignent une rémission à long terme sous traitement. Cette situation impose donc d'étudier de nouvelles pistes thérapeutiques.

La PR est caractérisée par une inflammation de la membrane synoviale au sein de l'articulation. Cette inflammation chronique est le résultat d'un équilibre altéré entre les cellules effectrices et régulatrices de la réponse immune systémique et locale. Dans l'articulation, la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, processus appelé néo-angiogenèse, contribue de façon majeure à cette inflammation par l'apport de composants pro-inflammatoires. En même temps, les molécules impliquées dans l'angiogenèse ont aussi un effet sur les cellules immunitaires effectrices et régulatrices. Aussi, dans l'articulation arthritique, il existe une interconnexion profonde entre l'angiogenèse et la réponse immunitaire qui peut jouer un rôle majeur dans la mise en place et le maintien du processus inflammatoire chronique.

Par analogie aux approches visant la néo-angiogenèse tumorale, il pourrait être intéressant et novateur de cibler, au même temps que l'inflammation, la néo-angiogenèse synoviale de la PR. Notre objectif est de valider le rôle fonctionnel de cibles angiogéniques et inflammatoires *in vivo* dans un modèle murin d'arthrite expérimentale. Cette étude nécessitera l'utilisation de 495 souris au maximum. Le nombre d'animaux a été limité au minimum pour obtenir une puissance statistique suffisante.

Nous évaluerons le développement de l'arthrite et de la néo-angiogenèse synoviale à l'aide de paramètres cliniques, d'imagerie et d'histologie. Un suivi très précis est mis en place pour éviter toute souffrance inutile des animaux, des points-limites ont été établis avec une grille d'évaluation qui a été développée spécifiquement pour ce type d'étude.

La finalité de cette étude est le développement futur de nouvelles stratégies thérapeutiques anti-angiogéniques ou anti-inflammatoires dans la PR pour remplacer ou être associées aux traitements actuellement disponibles.

10145 La polyarthrite rhumatoïde (PR) est une maladie qui touche 0,5-1% de la population mondiale, à raison de trois femmes pour un homme.

C'est une inflammation des articulations avec une prolifération non-contrôlée de leurs cellules : les synoviocytes, qui refusent de rentrer en mort cellulaire programmée (apoptose). Malgré les progrès thérapeutiques, cette inflammation des articulations persiste chez certains patients et détruit les articulations. Il a été remarqué que les taux de Cadmium et de Zinc sont diminués chez les patients PR.

L'équilibre de ces deux métaux a été étudié sur des synoviocytes issus de patients PR.

Nos résultats montrent que des doses légères de métaux, en accord avec les recommandations de l'organisation mondiale de la santé (OMS), permettent de limiter la prolifération cellulaire incontrôlée et l'inflammation dans la PR. Ces résultats prometteurs ont ensuite été transposés à une échelle physiologique et à montrer son efficacité chez le rat.

Cependant la modalité d'injection n'est pas optimale et il existe une diffusion systémique pouvant être associée à des effets secondaires. Le but est d'optimiser la modalité de délivrance et de s'assurer une rétention intra-articulaire en axant les travaux sur le cadmium qui a montré une plus

grande efficacité. Dans ces conditions (optimisation de la délivrance du Cadmium), il est essentiel de tester à nouveau l'efficacité et l'absence de toxicité de ce traitement dans l'organisme sur un modèle animal de PR.

Nous ne pouvons pas remplacer cette étape sur l'animal, il faut évaluer en deux temps :

1/ une évaluation de la toxicité du cadmium

2/ une évaluation de l'efficacité du cadmium.

Le modèle choisi est le rat. Chez cet animal nous bénéficions d'un modèle d'arthrite induite parfaitement maîtrisé et ayant une bonne ressemblance en termes de physiopathologie et de toxicité vis à vis des métaux lourds.

Le design de l'étude a été une longue discussion entre les différentes personnes impliquées dans le projet afin de réduire au maximum le nombre de groupes et le nombre d'animaux par groupe tout en garantissant une qualité d'analyse pertinente.

Notre projet inclura au maximum 170 animaux, tests de toxicité compris.

Enfin, nous avons cherché à raffiner les étapes de l'expérimentation : les injections seront réalisées sous anesthésie gazeuse. Le suivi clinique de chaque animal sera réalisé grâce à des indicateurs systémiques et locaux reconnus dans l'arthrite, et plusieurs points limites ont été mis en place. Tout particulièrement, l'accent sur la toxicité éventuelle de l'administration de métaux à faibles doses sera rigoureusement appréhendé.

Chaque animal bénéficie d'une attention et de soins de qualité, par du personnel qualifié, pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude. La douleur est rigoureusement contrôlée grâce à des points limites évalués en amont, et géré grâce aux moyens pharmacologiques appropriés (myorelaxant, anesthésie/analgésie dont le paracétamol).

Par ailleurs, les animaux sont hébergés en groupes harmonieux (par 2 ou 3); dans un environnement enrichi (copeaux, matériel de nidification, bâtonnets à ronger). Enfin, l'eau et la nourriture sont mises à disposition "ad libitum" et de la musique est diffusée en salle d'hébergement pour diminuer le stress et atténuer les bruits environnementaux.

10146 Différentes stratégies alimentaires (nature et quantité d'aliments) sont mises en place pour les animaux d'élevage. Ces stratégies visent en premier lieu à faire transformer de la biomasse primaire végétale en produits animaux riches en protéines. L'efficacité de transformation de cette biomasse est métaboliquement et économiquement très variable et peut s'accompagner de rejets « indésirables ».

Ce projet vise donc à quantifier certaines réponses animales (ingestion, digestion, croissance, production laitière, émissions non alimentaires (gaz, fèces, urines), santé (parasitisme gastro-intestinal), reproduction. Les principales espèces animales étudiées sont les caprins, les ovins, les bovins et les porcs. Des essais ponctuels - moins analytiques - de type essais "en ferme", seront réalisés sur d'autres espèces animales (volailles, lapins).

L'objectif du projet est d'évaluer les réponses multiples d'animaux d'élevage à différentes stratégies alimentaires. Il n'y a pas de méthodes alternatives satisfaisantes en l'état actuel des connaissances. Ce projet associe 2 types d'essais : 1) des essais avec des animaux en production (672 agneaux et/ou chevreaux, 384 porcs en croissance, 648 brebis et/ou chèvres allaitantes) conduits dans les conditions d'un élevage classique où la production de viande et de lait de ces animaux sera mesurée. Des prélèvements de sang sont également réalisés pour effectuer des bilans nutritionnels et parasitaires. 2) des essais de digestion avec des animaux canulés (12 béliers, 3 vaches et 12 porcs) placés dans des loges individuelles où des prélèvements de contenu digestif seront réalisés pour effectuer des bilans de la digestion. Certains animaux pourront être équipés de cathéters jugulaires pour réduire le stress lié à des prises de sang répétées. Au total, 1731 animaux seront utilisés.

Pour les animaux opérés, l'antibiotique sera associé à un anti-inflammatoire non stéroïdien pour, entre-autres, soulager la douleur. Le comportement des animaux (dont le comportement alimentaire) est observé quotidiennement afin d'identifier d'éventuels écarts relativement à la norme

10147 Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez la femme et reste encore le plus mortel malgré des progrès thérapeutiques notables basés sur la chirurgie, radiothérapie et chimiothérapie. Ce cancer regroupe en fait plusieurs entités qui varient sur le plan clinique et biologique d'une patiente à l'autre notamment en terme de réponse à un traitement donné et de dissémination métastatique et aussi de dépendances aux hormones oestrogéniques. Cette dernière est responsable de l'évolution défavorable de la maladie liée à l'apparition de métastases résistant aux traitements actuels. Améliorer l'efficacité des traitements nécessite de mieux comprendre la biologie des cellules tumorales pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles et d'envisager une approche de thérapie personnalisée, c'est-à-dire adaptée à un patient donné.

Notre projet vise à modéliser l'évolution d'un cancer mammaire chez un hôte murin pour augmenter nos connaissances biologiques des cellules tumorales et tester l'efficacité de nouvelles molécules potentiellement anti-tumorales dans différents types de cancer du sein à un stade primaire (tumeur localisée au niveau mammaire) ou bien métastatique (cancer métastasé). Il se déroule après une étude préliminaire réalisée sur des cellules ou tissus tumoraux en culture pour évaluer la sensibilité ou résistance des cellules tumorales à un traitement donné et est une étape nécessaire, en tant que modèle préclinique, à l'utilisation en essais cliniques chez les patients de ces nouveaux traitements.

Il se déroulera en 3 phases :

1) Création des modèles murins de Xénogreffes Dérivées de Patients (ou PDX)

Cette étape consiste à réaliser des greffes de fragments tumoraux de patientes atteintes de cancer du sein qui ont bénéficié d'une exérèse chirurgicale de leur tumeur, sur des souris immunodéprimées au niveau de leurs glandes mammaires, à les amplifier et les caractériser sur les plans histologiques, génomiques et fonctionnels incluant leur potentiel métastatique ou angiogénique. L'utilisation éventuelle de souris ovariectomisées permettra aussi d'évaluer leur dépendance aux œstrogènes. Ces modèles permettent de suivre l'évolution de la tumeur humaine sur la souris à la fois pour mieux comprendre les mécanismes biologiques sous-jacents, identifier les cibles potentiellement intéressantes pour bloquer les processus de prolifération, dissémination, résistance aux traitements et enfin tester de nouveaux agents anticancéreux. Ils sont donc un atout majeur pour la recherche translationnelle en oncologie et la médecine personnalisée.

2) Sélection des modèles PDX et modélisation de la maladie résiduelle pour un traitement spécifique
Déterminer la sensibilité ou résistance à un traitement donné (agent de chimiothérapie conventionnelle ou molécules innovantes) d'un modèle PDX par rapport à son évolution en absence de traitement, est une étape essentielle. En effet, chaque modèle PDX est unique et sa réponse aux traitements est spécifique. Cette étape permet d'évaluer l'effet d'un traitement sur la tumeur primaire au niveau mammaire et aussi sur l'apparition de métastases. Elle permet également de modéliser la maladie tumorale résiduelle éventuelle qui correspond à la persistance de cellules tumorales après la phase initiale de traitement par un agent incomplètement efficace. Cette maladie résiduelle directement liée au risque de récurrence du cancer le plus fréquemment sous sa forme la plus dangereuse, c'est-à-dire, métastatique, est actuellement le problème majeur du traitement des cancers. Cette phase du projet permet de sélectionner le ou les PDX pertinents pour le traitement envisagé.

3) Etude de la maladie résiduelle après traitement de la tumeur

Les modèles PDX traités par un agent donné (conventionnel ou innovant) fourniront les cellules tumorales résistant à ce traitement pour une analyse biologique poussée et un support pour définir quel type de traitement permettra le contrôle de cette maladie résiduelle, c'est-à-dire son éradication ou son absence d'évolution vers des métastases létales.

Cette phase ultime du projet est essentielle pour améliorer le traitement des cancers du sein qui récidivent après la première ligne de traitement et qui évoluent alors de manière très péjorative entraînant à terme la mort des patientes.

Notre projet vise à déterminer l'efficacité de nouvelles molécules potentiellement anti-tumorales sur différents types de cancers du sein. Si certaines données expérimentales peuvent être obtenues sur des cultures de cellules, de tissus et/ou des organes isolés, les études sur l'organisme entier, avec toute la complexité de ses interactions physiologiques, sont exigées pour poursuivre les essais en phase clinique.

Pour notre projet, en se basant sur le taux de prise de greffe le plus faible, 3030 animaux maximum seront nécessaires sur 5 ans. Ce nombre pourra être réduit si le taux de greffe est maximal :

- 1) Création des modèles PDX : 480 souris
- 2) Sélection des modèles PDX : 450 souris
- 3) Etude de la maladie résiduelle : 2100 souris.

Lors de notre projet nous tenons à respecter la règle des 3R : formation du personnel aux outils statistiques, utilisation de protocoles validés et robustes issus de la bibliographie, mutualisation des animaux et des techniques, utilisation de mâles qui seront castrés et mis sous œstrogènes, enrichissement de l'habitat et gestion du stress et de la douleur des animaux et administration de traitements préalablement testés ex vivo.

10148 Parmi les cancers hépatiques, les carcinomes hépatocellulaires (CHC) sont les tumeurs primaires les plus fréquentes (90%). Ils représentent actuellement la deuxième cause de mortalité liée au cancer au monde. Dans les pays occidentaux, les facteurs étiologiques principaux sont des infections chroniques par les virus de l'hépatite C et la consommation abusive d'alcool mais plus récemment l'obésité (suite à une sédentarisation et une alimentation plus riche). Le taux de survie à 5 ans des patients atteints d'un CHC n'excède pas 20% et la chirurgie qui reste le principal traitement curatif ne concerne qu'une minorité d'entre eux (~30%). La chimiothérapie ne confère quant à elle que quelques mois de survie supplémentaires. Afin de proposer de nouvelles thérapies efficaces il est donc indispensable de décrypter les mécanismes moléculaires impliqués. L'expérimentation animale est nécessaire de par la relation complexe qui existe entre les différents types cellulaires présents au sein d'une tumeur et les paramètres physiologiques ne pouvant être reproduits in vitro. Plusieurs modèles murins de cancer du foie ont été développés et ont permis entre autres d'identifier des mutations d'un oncogène retrouvé dans les CHC humains. Des mutations de cet oncogène sont un des principaux événements retrouvés dans le développement de CHC chez l'homme. Un modèle murin reproduisant fidèlement cette pathologie a été développé par notre équipe. Il a permis d'identifier des modifications métaboliques accompagnant la tumorigenèse due à l'activation anormale de cet oncogène. Ces modifications métaboliques font partie intégrante du processus oncogénique et notre programme de recherche consistera à comprendre leurs mécanismes et leur rôle dans la transformation tumorale. Afin de respecter la règle des 3R, des méthodes alternatives utilisant des cellules primaires issues de ces souris seront utilisées pour analyser les mécanismes moléculaires. Cette approche in vitro permet aussi de tester de nombreux effecteurs sur une même culture et donc limite le nombre d'animaux. En parallèle, le nombre d'animaux utilisé sera réduit à son minimum permettant des analyses statistiques valables. Afin de mener à bien cette étude, nous prévoyons l'utilisation de 296 souris sur une période de 4 ans. Enfin, pour limiter l'angoisse et la souffrance animale, une surveillance quotidienne sera réalisée, intensifiée pendant les phases potentiellement délétères et en respectant des points limites définis, au-delà desquels les animaux recevront un analgésique ou seront euthanasiés. Les protocoles d'induction de tumeurs que nous utilisons sont génétiques et n'entraînent pas de souffrance.

Les analyses potentiellement stressantes se feront sous anesthésie générale. Nous suivrons le développement tumoral par une approche non invasive, l'échographie, qui permet une étude longitudinale, limitant très fortement le nombre d'animaux nécessaires et surtout permettant de suivre la croissance tumorale. Cette méthode permet de faire nos études sur des tumeurs de petite taille, à des stades précoces, ce qui évite ainsi la souffrance engendrée par un développement tumoral important.

A terme cette étude permettra le développement de nouvelles approches/stratégies thérapeutiques ciblant spécifiquement cette classe de CHC actuellement incurables. Notre hypothèse est que la reprogrammation métabolique et le stress oxydatif potentiellement associé à cette reprogrammation ont un effet majeur dans la carcinogenèse hépatique. A terme cette étude devrait permettre le développement de nouvelles approches et stratégies thérapeutiques ciblant spécifiquement cette classe de CHC qui manque cruellement d'options thérapeutiques à l'heure actuelle.

10149 Les anticorps sont générés par le système immunitaire chez l'homme ou les animaux en réponse à l'exposition à un immunogène (un immunogène est une molécule capable d'induire une réponse immunitaire) On les retrouve en quantité importante dans le sang.

Ils ont pour caractéristique de reconnaître spécifiquement l'immunogène contre lequel ils ont été générés et de s'y fixer.

Cette caractéristique fait des anticorps poly-clonaux un outil indispensable pour la détection et la quantification de molécules d'intérêt. C'est pourquoi ils ont de très nombreuses applications en recherche et sont utilisés dans de nombreuses techniques.

L'objectif de ce projet est la production d'anticorps poly-clonaux par des lapins new zealand white. Ces anticorps sont destinés à être utilisés dans des applications en recherche.

Le lapin new zealand white est l'animal de laboratoire le plus adapté au développement d'anticorps poly-clonaux pour la recherche. Il montre en effet une très bonne réponse immunitaire et permet de récolter une quantité de sang suffisante pour les applications en recherche.

Nous pouvons indifféremment utiliser les femelles et les mâles.

Le remplacement du modèle in vivo ne peut être envisagé car la réponse immunitaire est un phénomène complexe impliquant la coopération entre de multiples types cellulaires, pour lequel il n'existe pas d'équivalent in vitro.

Dans un objectif de réduction, nous n'utilisons que la quantité d'animaux strictement nécessaire à l'obtention de la quantité de sérum attendue. En fonction des demandes que nous recevons nous prévoyons d'utiliser jusqu'à 500 lapins par an, 1000 lapins sur 2 ans.

Dans un objectif de raffinement, tous les actes réalisés le sont en conformité avec les bonnes pratiques en expérimentation animale et les recommandations édictées sur le sujet. De plus, tous nos lapins sont quotidiennement surveillés par le personnel animalier en charge de l'entretien des animaux et lors des injections ou des prélèvements. Ainsi, l'état général des animaux, mais aussi leur consommation de nourriture et leur consommation hydrique sont suivis. La détection d'une blessure, de signes d'un état général dégradé, d'une souffrance ou d'une angoisse entraîne l'arrêt de l'expérimentation et l'euthanasie de l'animal.

10150 La présente demande concerne un projet d'enseignement destiné à des étudiants de 2ème année de DUT génie biologique option analyses biologiques et biochimiques qui implique l'évaluation en TP de l'activité biologique de molécules médicamenteuses de référence sur des modèles in vivo. Le projet inclue 12h de travaux pratiques.

Pédagogiquement, ces TP illustrent les cours dispensés en physiologie.

Ils sont l'occasion pour les étudiants de « mettre en œuvre des techniques d'expérimentation animale » (compétence visée dans le programme pédagogique national (PPN)) en réalisant des techniques de contention et d'injections aux rongeurs.

Ils permettent également « d'évaluer en TP l'activité biologique de molécules médicamenteuses de référence sur des modèles in vivo » (indiqué dans le PPN) dans le but de connaître l'activité pharmacologique d'une molécule. L'utilisation des animaux ne peut donc pas être remplacée.

Les 12 heures sont réparties en 2 séances et nécessitent 36 souris par an (soit 180 souris en 5 ans). Une première séance de 6h permet aux étudiants de tester l'effet de différents psychotropes et de l'atropine chez la souris. Les étudiants observent les modifications comportementales et physiologiques des rongeurs grâce à des tests adaptés : planche à trous, barre fixe, cheminée, sécrétion de salive. Une deuxième séance de 6h aura pour but de suivre les variations de glycémie des rongeurs en réponse à l'injection de glucose ou d'insuline.

Ces travaux pratiques d'expérimentation animale enrichissent également le curriculum vitae des étudiants qui sont pour certains amenés à postuler dans des établissements utilisateur d'animaux à des fins scientifiques.

Pour réduire le nombre d'animaux, les étudiants travaillent en groupe, et les animaux utilisés servent à plusieurs séances de TP. Une fois euthanasié, les animaux sont en plus utilisés pour les TP de dissection.

Pour le raffinement des procédures, les enseignants veillent à ce que les animaux soient manipulés de manière à limiter au maximum le stress des animaux et des étudiants.

Les animaux proviennent d'un élevage agréé. Le bien-être des animaux est suivi par du personnel formé quotidiennement 7j/7. Les animaux seront hébergés dans des cages standard, aux normes européennes avec de l'enrichissement. Les principes éthiques et les standards de raffinement sont utilisés jusqu'à l'euthanasie de l'animal.

10151 La transplantation d'organes est la thérapie principale permettant de palier à la défaillance de certains organes. La transplantation d'un rein est historiquement la première à avoir été réalisée et, depuis, le rein est l'organe le plus greffé. La transplantation rénale est la meilleure thérapie de l'insuffisance rénale chronique en améliorant de manière significative la durée et la qualité de la vie des patients, tout en permettant de réduire considérablement les coûts liés au traitement de l'insuffisance rénale par la dialyse. Cependant, le manque actuel de greffon et la diminution de leur qualité (donneurs âgés et aux multiples maladies) sont des problèmes majeurs limitant cette thérapeutique.

La thérapie cellulaire est une technique qui a fait l'objet de nombreux essais cliniques dans de nombreux domaines de la médecine. Certaines de ces études ont démontré les effets de cellules souches notamment celles issues de la moelle osseuse sur la réparation et la régénération des tissus et des organes ainsi que sur la modulation de la réponse immunitaire à l'origine des rejets de greffes. Le mécanisme d'action de ces cellules le plus probable serait la sécrétion de molécules (sécrétome) au contact des tissus lésés.

Dans le but d'élargir le nombre de greffon disponibles et d'améliorer leur devenir, nous proposons donc dans cette étude d'évaluer l'effet thérapeutique de cellules souches issues de la moelle osseuse (ou de leur secretome) dans un modèle préclinique. Notre hypothèse est que ces cellules limiteraient les lésions du greffon causées par l'ischémie-reperfusion (absence temporaire de nutriments et d'oxygène), survenant entre le prélèvement du rein et sa transplantation, et ainsi optimiser la fonction et la survie de ces greffons.

Le modèle serait un modèle d'ischémie transitoire par clampage du rein chez la souris (occlusion des vaisseaux apportant nutriments et oxygène au tissu). Les cellules seraient injectées lors de la reperfusion (désocclusion des vaisseaux) après une ischémie de 15 minutes. Le protocole chirurgical est réalisé chez des souris C57BL6 sous anesthésie générale et analgésie adaptée. Les animaux seront suivis tout au long de la chirurgie et en post-opératoire. Pour mimer les conditions rencontrées en clinique, où les organes sont lésés par la période se déroulant entre leur prélèvement et leur transplantation, le protocole sera composé successivement de :

- clampage de l'artère rénale gauche pendant 15 minutes (ischémie)
- déclampage de l'artère (reperfusion). Durant ce dernier temps opératoire, le rein droit sera prélevé : seul le rein gauche (qui aura été ischémié) restera donc fonctionnel.
- Les cellules souches ou leur secretome (issus de la moelle osseuse, prélevée à partir d'un fémur issu d'une souris de la même souche) seront injectées au niveau du rein gauche.
- Deux durées de suivi de l'animal (24h et 15 jours) seront prévues, afin d'évaluer l'effet de ces cellules à la fois sur la reprise de fonction du greffon et sur l'apparition de lésions rénales chroniques. Outre la phase pilote, ce sont 8 groupes expérimentaux qui seront analysés pour un total de 92 animaux maximum pour ce projet.

Prise en compte de la règle des 3R :

Cette thérapie régénérative ne peut être remplacée par des modèles cellulaires en raison des très nombreux types cellulaires composant le rein et de la complexité des mécanismes induits par la transplantation rénale. Ainsi, ce projet ne peut être évalué que dans un modèle in vivo chez l'animal tant pour la mise au point du produit de thérapie cellulaire (cellules souches de la moelle osseuse et secretome) que pour l'aspect préclinique chez le petit animal (remplacement).

L'étude pilote d'optimisation du procédé d'injection des cellules ou du secrétome permet de réduire le risque de biais expérimental et limiter l'hétérogénéité des résultats. Le nombre d'animaux par groupe (n=9) est réduit au minimum nécessaire pour permettre une analyse statistique fiable des résultats (réduction).

La chirurgie d'ischémie-reperfusion, parfaitement maîtrisée au laboratoire, est entièrement réalisée sous anesthésie. Les traitements anesthésique et analgésique ont par ailleurs été mis au point par des médecins anesthésistes réanimateurs dans le but de réduire au mieux la souffrance des

animaux. Une surveillance quotidienne sérieuse, avec évaluation du réveil et de l'état de santé post-opératoire, permet de détecter rapidement toute complication et d'adapter immédiatement la prise en charge, en respect des points limites préétablis, en particulier par un traitement analgésique adapté (raffinement).

10152 Dans le cadre de la fabrication d'un médicament, un test d'activité doit être réalisé sur souris. Il s'agit d'un test réglementaire de contrôle qualité chez l'animal indispensable pour la libération de produit pharmaceutique (décrit dans les dossiers d'AMM-autorisation de mise sur le marché). Cet essai permet de vérifier par des techniques de dosage immunologique la production des anticorps d'intérêt dans le sérum des souris. Des groupes de 10 souris sont utilisés pour un lot de produit. Le nombre de lots annuel prévisionnel est de 6. La quantité d'animaux utilisés est donc de 60 souris par an, soit 180 souris pour la durée totale du projet (3 ans). 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. Les prélèvements sanguins seront réalisés sous anesthésie générale.

10153 Ce projet consiste à tester chez la souris le pouvoir adjuvant de petites molécules capables de stimuler la réponse immunitaire qui pourraient être utilisées comme nouveaux adjuvants vaccinaux, et cela notamment dans le but de remplacer les sels d'aluminium dont l'utilisation est aujourd'hui contestée. En effet, tout vaccin se doit de combiner un antigène contre lequel l'organisme va produire des anticorps et/ou des lymphocytes cytotoxiques, et un adjuvant dont le but est d'activer le système immunitaire. Ces deux éléments combinés sont essentiels à l'induction d'une bonne réponse immunitaire. Nous avons identifié au laboratoire trois familles de molécules capables d'activer en culture des cellules immunitaires humaines purifiées à partir du sang de donneurs sains. Pour valider l'effet adjuvant de 3 composés appartenant à chacune de ces familles chimiques, nous les testerons chez la souris dans un modèle d'immunisation et de suivi de la réponse immune. En effet, aucun modèle in vitro ne permet de mimer l'immunisation contre un antigène et nous avons besoin d'un système intégré qui présente toutes les composantes de la réponse immunitaire, à la fois au niveau tissulaire et cellulaire. Pour cela, les souris seront vaccinées contre l'ovalbumine en présence ou en absence des molécules que nous souhaitons tester, par comparaison avec les sels d'aluminium. Nous mesurerons l'amplitude de la réponse immunitaire induite contre l'ovalbumine sur des prélèvements de sang réalisés sous anesthésie générale et sur des tissus prélevés en post mortem. Ces nouvelles molécules sont totalement organiques et, contrairement aux sels d'aluminium, devraient être dégradées par l'organisme une fois qu'elles auront joué leur rôle. Par ailleurs, les sels d'aluminium produisent principalement une réponse anticorps et peu de lymphocytes T cytotoxiques alors qu'une réponse plus équilibrée est souhaitable dans la vaccination contre des pathogènes intracellulaires (paludisme, virus, etc.). Seul un test in vivo chez la souris nous permettra de déterminer quel type de réponse induisent les molécules identifiées au laboratoire.

L'ensemble du programme implique l'utilisation de 75 animaux. Dans un souci de réduire au maximum le nombre d'animaux requis tout en permettant d'obtenir des résultats significatifs, les différentes procédures expérimentales ont été consciencieusement élaborées en suivant la règle des 3R et une approche statistique a été réalisée. Notamment, notre procédure permettra de suivre successivement sur les mêmes animaux la réponse immunitaire anti-ovalbumine globale et l'activation immunitaire locale. Une surveillance attentive et un enrichissement des cages permettront d'assurer le bien-être des animaux. Afin de limiter au maximum la souffrance des animaux, les prélèvements de sang seront réalisés sous anesthésie générale. En cas de souffrance et/ou détresse, l'animal sera immédiatement euthanasié quel que soit le moment de la procédure. Ce programme permettra d'identifier de nouveaux adjuvants à base de molécules organiques dégradables par l'organisme contrairement aux sels d'aluminium, et donc utiles pour le développement de vaccins chez l'homme ou l'animal.

10154 Pour traiter certaines maladies hématologiques, comme des leucémies, on recourt de plus en plus à la greffe de moelle osseuse. Le greffon, qui comporte des cellules du sang, donc parmi elles de l'immunité, sert à détruire les cellules malades de l'hôte et à remplacer ses cellules sanguines ; mais il peut reconnaître les tissus de l'hôte comme étranger et déclencher une réponse immunitaire contre lui : c'est la maladie du greffon contre l'hôte (GvH). Cette maladie se déclare à 40% dans les semaines ou mois suivant une greffe de moelle osseuse ; la survie à un an est de 50%. Aujourd'hui, la GvH est traitée par immunosuppresseurs. Or, ils diminuent la capacité du greffon à détruire les cellules sanguines malades de l'hôte.

Notre projet vise donc à étudier la GvH et essayer de l'éviter, ou d'en minimiser l'intensité. Notre stratégie consiste à traiter les souris avec une préparation purifiée de glycoprotéine 96 (Gp96), protéine au pouvoir de modulation de la réponse immunitaire, qui pourrait donc éviter l'activation des cellules immunitaires du greffon contre les tissus de l'hôte.

Nous purifierons cette protéine à partir de foies et de rates de souris (utilisées à cet effet). Il n'est pas possible d'utiliser la protéine Gp96 commerciale, car elle n'est pas totalement identique à la Gp96 « naturelle », et des études ont montré qu'elle serait probablement inefficace.

Un modèle animal est nécessaire car l'objectif est de tester l'efficacité d'une vaccination in vivo. Le modèle GvH chez la souris est bien décrit dans la littérature et déjà maîtrisé dans notre laboratoire. Il nous permettra d'observer l'effet du traitement sur l'état clinique des souris selon une méthode établie (score clinique basé sur l'observation de symptômes connus), et d'explorer la réaction de leurs organismes organe par organe.

Nous estimons à 96 le nombre total de souris utilisées sur la durée du projet pour obtenir des résultats statistiquement exploitables, y compris les souris utilisées pour la purification de la protéine Gp96.

Ce nombre d'animaux a été réduit au maximum et estimé à partir de notre expérience dans le design d'études similaires. Il correspond au nombre minimal permettant d'obtenir une étude statistique valable avec les tests prévus.

Toutes les souris seront surveillées attentivement pendant la durée de l'étude ; si elles atteignent les points limites établis (score clinique supérieur à 5/10), elles seront euthanasiées selon l'une des méthodes acceptées par la législation.

Les souris seront hébergées dans un environnement enrichi et adapté pour réduire le risque d'infections et de l'eau et de la nourriture seront mises à disposition facilitée pour éviter déshydratation et dénutrition.

Nous nous attendons que les souris GvH vaccinées avec la préparation purifiée de Gp96 endurent une maladie atténuée. L'exploration sur leurs organes doit montrer les signes de dégâts moindres et d'une activation immunitaire moindre par rapport aux souris GvH non vaccinées.

Ces résultats pourraient ouvrir la voie à une approche thérapeutique visant à améliorer la prise en charge des patients atteints par la GvH.

10155 Notre laboratoire s'intéresse à l'amélioration de la production de foie gras tout en respectant le bien-être animal. Il a notamment été montré que certaines espèces de canard présentent une meilleure accumulation des graisses dans les tissus périphériques (tissu adipeux et muscles) et d'autres précisément dans le foie. C'est donc par croisement inter-espèce que le canard mulard a été obtenu, présentant le meilleur stockage hépatique et la meilleure capacité de gavage.

Aujourd'hui l'objectif de nos recherches est de limiter le temps et/ou le nombre de gavages ainsi que les variabilités de réponse, tout en maintenant une production de foie gras optimale. Nous souhaitons pour cela étudier l'impact d'une programmation thermique embryonnaire (modification de la température d'incubation des œufs) sur la stéatose hépatique induite par gavage chez le canard mulard.

La programmation thermique a été largement étudiée chez le poulet, pour comprendre et diminuer la mortalité observée dans les élevages en période de fortes chaleurs, ainsi que pour optimiser la production de viande en modulant la croissance musculaire. Chez le canard, une étude a récemment montré une forte augmentation du poids de foie chez les canetons (Pékin) âgés de 2 semaines.

Dans ce contexte il nous paraît donc intéressant d'explorer cette voie en mesurant l'impact de la température d'incubation des œufs sur la croissance et la stéatose hépatique induite par gavage chez le canard mulard adulte.

Pour cela, deux expérimentations sont envisagées :

- La première a pour objectif d'établir la meilleure période embryonnaire pendant laquelle modifier la température. Nous souhaitons faire cette étude chez trois souches de canard : Barbarie, Pekin et mulard, afin de comparer les étapes clés du développement et d'identifier ainsi de potentielles différences du métabolisme. Pour cela, nous prévoyons de prélever des embryons durant toute l'embryogenèse (tous les 4 jours) et jusqu'à 4 jours post-éclosion pour analyser l'expression génétique des facteurs impliqués dans le développement et la physiologie hépatique. Nous prévoyons donc de faire un total de 810 prélèvements dont 630 embryons et 180 canetons nouveaux.

- La seconde expérimentation vise à tester différentes conditions d'incubation, afin de déterminer si la programmation thermique embryonnaire peut améliorer la stéatose hépatique induite par gavage chez le canard mulard adulte. Nous prêterons une attention particulière à l'impact du traitement thermique sur le taux d'éclosion, le sexe ratio ou la qualité des poussins à la naissance et au cours de l'élevage.

A partir des données bibliographiques, et ayant à disposition 4 incubateurs nous souhaitons tester 4 conditions d'incubation chez les canards mulards. Les œufs mulards seront incubés dans 4 incubateurs différents dans lesquels seront testés 4 conditions de température et d'hygrométrie différentes. Trois prélèvements d'embryons auront lieu pendant l'incubation (avant, pendant et en fin de programmation), puis un prélèvement à 2 semaines post-éclosion permettra de voir les effets de la programmation à court terme (30 mâles et 20 femelles seront prélevés dans chaque groupe, soit 200 canetons). Une fois adulte, une autre série d'animaux (40) sera euthanasiée avant le gavage et une dernière (50 animaux par groupe) en fin de gavage (21 repas), soit un total de 360 canards adultes.

Le nombre total d'animaux euthanasiés au cours des deux expériences s'élève donc à 380 canetons (âgés de 15 jours maximum) et 360 canards adultes.

Les prélèvements sanguins n'auront lieu qu'après la mort des animaux.

Remplacement : Compte tenu de l'objectif zootechnique, les animaux ne peuvent pas être remplacés par des modèles in vitro.

Réduction : Le nombre d'animaux prélevés aux différents stades des deux expériences est réduit à son minimum pour espérer avoir des conclusions significatives. Seuls les mâles seront élevés et gavés pour l'expérimentation n°2. L'utilisation des embryons au cours de la première expérimentation a pour objectif de réduire le nombre de conditions testées (et donc le nombre de canards adultes) utilisés pour la seconde expérimentation.

Raffinement : Les œufs et canards feront l'objet d'une surveillance quotidienne. Toute manifestation de troubles comportementaux persistants entraînera le retrait de l'animal de l'expérimentation. Des chainettes seront mises à disposition dans les salles d'élevage afin de diminuer leur stress et les comportements agressifs.

10156 Le risque de mort subite chez les patients épileptiques (SUDEP) est trois fois plus élevé que chez les personnes saines. Une des voies de recherche pour lutter contre la SUDEP réside dans la stimulation du nerf vague. Effectivement une des hypothèses actuelles repose sur l'idée que la SUDEP survient suite à une décharge vagale massive (DVM) durant la crise d'épilepsie qui précède la SUDEP. Il est donc envisagé de neutraliser la DVM en provoquant une contre-stimulation du nerf vague.

Nous travaillons sur un projet visant à contre-stimuler le nerf vague et nous souhaitons bénéficier d'un modèle physiologique simple pour optimiser les paramètres de contre-stimulation (intensité, fréquence, etc.) qui viendrait neutraliser la DVM. Nous proposons d'utiliser la réponse musculaire réflexe obtenue suite à la stimulation du nerf sciatique chez le rat. Alors que des rats seront sous anesthésie générale, le nerf sciatique de ces rats sera sujet à une stimulation invariable de faible intensité et, simultanément, contre-stimulé avec des paramètres encore inconnus dans le but de neutraliser la stimulation invariable. L'objectif du projet est de faire varier les différents paramètres

de la contre-stimulation (intensité, fréquence) pour en déduire les paramètres optimaux permettant d'obtenir le blocage du réflexe musculaire de la patte du rat.

Nous souhaitons faire varier l'ensemble des paramètres sur chaque rat testé soit un total de 100 combinaisons (la durée de test nécessaire pour une combinaison est d'environ 1 à 2 minutes ; soit une durée de stimulation totale de 2 à 3h par rat). Nous estimons que ce protocole appliqué à 10 animaux sera suffisamment puissant pour garantir la pertinence de paramètres optimaux inférés.

Nous souhaitons réaliser ces tests avec deux électrodes de stimulation différentes, une électrode commerciale standard et une électrode nouvellement développée pour maximiser la conductance avec le nerf permettant de diminuer les intensités de stimulation nécessaires pour obtenir la même efficacité de blocage. Au total, 20 rats (deux lots de 10 rats) seront nécessaires pour mener ce projet.

Concernant la règle Remplacement-Réduction-Raffinement, il n'est pas envisageable d'utiliser une approche in vitro en remplacement de l'approche in vivo puisque le trait évalué correspond à la réponse mettant en jeu tout un processus physiologique intégré chez un sujet respirant. La taille des échantillons est calculée pour permettre une mise en évidence d'un quelconque effet significatif connaissant la taille de l'effet attendu dans la population parente modulée par l'expérience que nous avons du trait mesuré. Enfin, notre protocole suit des procédures standardisées soucieuses de minimiser le stress et toute souffrance des animaux avec une détermination précise des points limites. Ceci se traduit par une visite quotidienne à l'animalerie pour contrôler le bien-être des animaux, l'enrichissement des cages autant que faire se peut, le respect des normes liées aux surfaces/volumes des cages pour éviter la surpopulation ainsi que celles liées aux plages acceptables pour la température et l'hygrométrie. Les animaux seront sous anesthésie générale durant la totalité de l'expérimentation et l'électrocardiogramme (ECG) sera enregistré pour détecter des effets indésirables créant un inconfort chez le rat (augmentation de la fréquence cardiaque).

10157 Le test pyrogène sur lapins est décrit dans les Pharmacopées internationales, qui sont les référentiels pharmaceutiques pour la réalisation des tests de contrôle qualité.

L'objectif de ce test est de détecter la présence de molécules pyrogènes, c'est-à-dire pouvant provoquer une augmentation de la température, à l'intérieur de produits pharmaceutiques ou médicaments expérimentaux. Pour cette détection, le produit à tester est injecté à un groupe de 3 lapins, et la température de ces animaux est mesurée afin de déterminer la hausse de température éventuelle.

Cet essai ne peut pas aujourd'hui être réalisé ex vivo pour plusieurs raisons :

- Le test des endotoxines bactériennes, qui peut être utilisé comme variante au test pyrogène, ne détecte que les molécules type endotoxines, alors que le test sur lapins permet de détecter tout type de molécules pyrogènes.
- Il n'existe pas aujourd'hui d'équivalent in vitro au test pyrogène, qui soit validé et décrit dans les référentiels pharmaceutiques.
- Il s'agit d'un test réglementaire, obligatoire à partir du moment où il est enregistré dans le dossier d'AMM (autorisation de mise sur le marché) du produit.

La Pharmacopée s'exprime par rapport à l'expérimentation animale : « Conformément à la Convention européenne sur la protection des animaux vertébrés utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques (1986), la Commission s'est engagée dans la voie de la réduction de l'emploi d'animaux dans les essais de pharmacopée, chaque fois que possible, et elle encourage tous ceux qui contribuent à ses travaux à chercher des méthodes alternatives ne nécessitant pas l'emploi d'animaux. Un essai sur animaux n'est introduit dans une monographie que lorsqu'il a été démontré qu'il est nécessaire pour un contrôle satisfaisant aux fins de la Pharmacopée ».

Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés pour les tests pyrogènes, la réutilisation des lapins est possible pour un même projet après vérification de son bon état général, le respect d'une période de récupération adaptée et sous réserve que le lapin ne reçoive pas deux produits immunisants (dérivé du sang, antibiotique, produit à base d'anticorps).

Des méthodes alternatives in vitro existent pour ce test (test des endotoxines bactériennes, ou test MAT). Ces essais alternatifs sont proposés en systématique, il est donc demandé aux scientifiques une justification pour la réalisation du test

pyrogène in vivo.

Ces justifications peuvent être les suivantes :

- Méthodes in vitro non validables en fonction du produit testé,
- Test in vivo exigé pour certaines destinations de vente des médicaments,
- Test in vivo exigé dans les monographies des Pharmacopées.

Le nombre d'animaux prévu pour ces protocoles est d'environ 7 000 par an soit 35 000 pour la totalité du projet et permet l'évaluation de 45 000 lots de médicaments.

Le test pyrogène est une procédure peu traumatisante (uniquement injection de produit pharmaceutique), et la température est ensuite enregistrée en continu pendant plusieurs heures après injection. L'anesthésie n'est donc pas adaptée à cette procédure et serait plus traumatisante que la procédure elle-même.

En revanche, l'état des animaux est vérifié toutes les heures après l'injection jusqu'à la fin de l'essai, et la durée d'enregistrement des températures après l'injection est limitée à 5h30 maximum. Les animaux sont ensuite replacés dans leurs cages de stabulation pour qu'ils aient un accès à l'eau et l'aliment.

10158 Le risque de mort subite chez les patients épileptiques (SUDEP) est trois fois plus élevé que chez les personnes saines. Il existe un modèle idéal de SUDEP chez la souris correspondant à une crise épileptique induite par un stimulus sonore et possiblement suivi du décès (crise audiogène ou AGS pour « AudioGenic Seizures » en anglais). Seulement la réponse au stimulus sonore est parfois aléatoire car fondée sur des objets mécaniques telle une cloche électrique ou tel un sonicateur aux paramètres de stimulation invariables.

Notre projet vise à développer un stimulateur électronique permettant d'optimiser le stimulus sonore pour fiabiliser la réponse manifestée par une convulsion. Le stimulus sonore peut varier selon son intensité (dB), sa fréquence et sa forme. Nous testerons 199 souris en leur appliquant un stimulus sonore avec une intensité, une fréquence et une forme donnée. Ce nombre permettra de rendre compte de toutes les combinaisons possibles entre l'intensité ($80 < \text{dB} < 120$), la fréquence ($10 < \text{kHz} < 40$) et la forme (mono-fréquentiel < forme < bruit blanc). Chaque animal sera sollicité par un stimulus sonore, une seule fois et pendant une durée maximale de 60 sec.

Concernant la règle Remplacement-Réduction-Raffinement, il n'est pas envisageable d'utiliser une approche in vitro en remplacement de l'approche in vivo puisque le trait évalué correspond à la réponse mettant en jeu tout un processus physiologique intégré chez un sujet respirant. La taille des échantillons est calculée pour permettre une mise en évidence d'un quelconque effet significatif connaissant la taille de l'effet attendu dans la population parente modulée par l'expérience que nous avons du trait mesuré. Enfin, notre protocole suit des procédures standardisées soucieuses de minimiser le stress et toute souffrance des animaux avec une détermination précise des points limites. Ceci se traduit par une visite quotidienne à l'animalerie pour contrôler le bien-être des animaux, l'enrichissement des cages autant que faire se peut, le respect des normes liées aux surfaces/volumes des cages pour éviter la surpopulation ainsi que celles liées aux plages acceptables pour la température et l'hygrométrie. En cas, de poses d'électrodes cérébrales, les grilles employées sont plates pour éviter des chocs avec les électrodes ; la nourriture étant disposée à même la cage.

10159 Ce projet a pour but de tester des produits d'origine végétale ou des formulations de ces produits afin de déterminer leur effet en dialyse péritonéale in vivo (physiologie du transport au niveau du péritoine et biocompatibilité de la solution de dialyse). Ce type de dialyse permet d'éliminer des déchets tels que l'urée, la créatinine, l'excès de potassium que les reins ne parviennent plus à épurer du sang. L'évaluation de la physiologie du transport au niveau du péritoine, de la clairance des déchets et de la biocompatibilité de la solution de dialyse, suite à une injection intrapéritonéale de certains produits sont donc indispensables afin de pouvoir proposer de nouvelles solutions en dialyse péritonéale.

Le potentiel effet de clairance par dialyse péritonéale ainsi mesuré pour de nouveaux produits fonctionnels est donc étudié au travers de ce projet, aucune technique de remplacement (remplacer) n'est donc possible car des phénomènes physiologiques complexes de diffusion, d'absorption et

d'élimination sont nécessaires. Les effectifs sont fixés entre 4 et 10 rats par groupe. Nous prévoyons d'impliquer un maximum de 210 rats par an. D'après la littérature, cet effectif est suffisant et nécessaire pour s'assurer de la significativité des résultats et pour limiter le nombre d'animaux utilisés. Des tests de digestion in vitro simulant la dégradation dans la cavité péritonéale et des mesures des poids moléculaires et du pouvoir osmotique sont aussi réalisés au préalable afin de réduire le nombre de produits à tester (réduire). La méthodologie de dialyse péritonéale a été raffinée grâce à la littérature. Une dose connue et déterminée à l'avance de ces produits sera administrée par voie intrapéritonéale aux animaux. Des prélèvements de sang, de fluide abdominal et d'urine, seront effectués durant 120 minutes sur animaux anesthésiés (raffinement) tout au long de la manipulation.

Les différentes études incluses dans ce projet pourront permettre d'étudier l'effet potentiel en dialyse péritonéale d'un nouveau produit ou du mélange de nouveaux produits. Ce projet préclinique sur animal nous permettra de vérifier les meilleures doses ou les meilleurs mélanges de nos produits dans le cadre de la recherche sur des produits de dialyse péritonéale. Ce projet nous permettra de confirmer ou d'infirmer certaines hypothèses avant d'envisager le stade clinique.

10160 Les plaies au niveau de la bouche sont extrêmement fréquentes chez l'homme. Elles peuvent concerner les gencives ou les muqueuses au niveau des lèvres ou des joues. Leur origine est variée : ulcérations, petites blessures, plaies post chirurgicales suite à une extraction dentaire ou à la pose d'un implant. La vitesse de reconstitution des tissus lésés est un facteur clé dans le processus de cicatrisation, réduisant considérablement les manifestations symptomatologiques ainsi que les complications septiques. Les produits ou dispositifs susceptibles d'accélérer la cicatrisation au niveau buccal sont d'un grand intérêt.

Le présent projet consiste à reproduire chez le porc, dont les caractéristiques de la muqueuse buccale et des gencives sont très proches de celles de l'homme, des lésions ulcéreuses ou de petites plaies chirurgicales dans le but d'évaluer l'activité cicatricielle de nouveaux médicaments ou dispositifs médicaux. Pour cela, des lésions mimant des ulcérations buccales ou des plaies chirurgicales telles que celles que les chirurgiens-dentistes peuvent effectuer lors d'une extraction dentaire ou de la pose d'un implant, sont réalisées sur les animaux, sous anesthésie générale. Ces lésions sont ensuite traitées par des candidats médicaments ou de nouveaux dispositifs médicaux, en application locale une à plusieurs fois par jour, pour en évaluer l'efficacité dans le processus de cicatrisation. Les résultats sont objectivés par la mesure de la taille des lésions induites, à intervalles réguliers. Les données issues des zones traitées sont comparées à celles des zones non traitées ou traitées avec un produit de référence. Le bénéfice attendu est important dans la mesure où le besoin médical est croissant avec un développement massif de l'implantologie dentaire.

Bien que des modèles cellulaires et tissulaires soient utilisés pour évaluer l'activité de nouveaux médicaments sur la cicatrisation, il n'est pas possible de s'affranchir totalement d'un modèle animal complet pour tester l'efficacité de dispositifs médicaux, nécessitant plusieurs jours d'application, dans l'environnement buccal soumis de façon constante aux sécrétions salivaires, conditions qui la plupart du temps sont incompatibles avec les techniques in vitro de culture cellulaire. La réduction du nombre d'animaux nécessaires est possible au travers d'une utilisation sélective du modèle réservé aux candidats en développement et d'une standardisation très poussée des conditions expérimentales pour réduire au maximum la variabilité au niveau des lésions induites. Enfin, le raffinement de ce modèle expérimental s'opère au travers de l'utilisation d'une anesthésie générale lors de la réalisation des lésions, d'une tranquillisation ou d'une anesthésie gazeuse au masque pour l'administration de certains traitements, de la mise en œuvre d'un traitement antalgique préventif lors de l'anesthésie générale, d'un conditionnement préalable des porcs, d'un enrichissement du milieu (ex : litière, balles, tapis) et d'une surveillance particulière du comportement des animaux tout au long de l'étude.

Sur la base de deux études par an incluant jusqu'à 12 animaux chacune, un effectif maximal de 120 animaux sur 5 ans est nécessaire pour la conduite de ce projet.

10161 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, nous cherchons à identifier différents traitements pouvant aider à réduire les comportements répétitifs, l'hyperactivité, l'agressivité, et les troubles du comportement social.

Au sein de notre laboratoire, nous travaillons sur un gène de susceptibilité lié aux Troubles du Spectre Autistique : Shank3. Ce projet vise à identifier d'éventuels traitements atténuant les symptômes de l'autisme en utilisant une lignée de souris transgénique présentant une délétion de ce gène (lignée « Shank3KO »), utilisée comme modèle animal des Troubles du Spectre Autistique. Nous administrerons donc aux animaux différentes molécules par voie intra-péritonéale avant de tester leur comportement, notamment les comportements répétitifs et d'évitement, et le comportement social.

Règle des 3R.

Remplacer : Notre projet repose sur une approche intégrée nécessitant le fonctionnement du cerveau dans son intégrité, ce qui reste encore impossible à modéliser. 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.

Réduire : 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. Pour atteindre la puissance statistique nécessaire, un nombre minimum de 15 animaux est nécessaire pour chaque condition expérimentale. Nous travaillerons en parallèle sur des animaux mâles et femelles de notre modèle transgénique, qui présentent les mêmes phénotypes caractéristiques des Troubles du Spectre Autistique. Nous avons estimé le nombre total d'animaux nécessaire à ce projet de 5 ans à 660 animaux.

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 observés quotidiennement. 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.

10162 A) But du protocole expérimental sur mouton et chèvre.

Le projet a pour objectif de produire du plasma ou du sérum par prélèvement de sang dans le cadre de la recherche privée.

B) Le choix de l'animal s'est fait car le mouton est un très bon modèle pour ce type de protocole, ce qui permet d'optimiser au mieux la production et d'utiliser un nombre réduit d'animaux.

Cette méthode appliquée sur mouton et chèvre est une méthode validée, qui permet de satisfaire aux besoins, avec l'utilisation du nombre le moins élevé d'animaux possibles.

Il n'y a pas de méthode substitutive.

C) Un prélèvement de sang est effectué tous les 15 jours.

Nous utilisons environ 25 moutons et 5 chèvres.

La durée du protocole est de 5 ans.

Le nombre d'animaux utilisé correspond au minimum requis pour répondre aux objectifs.

D) Les moutons et les chèvres sont hébergés dans une bergerie qui leurs est dédiée, ne dépassant pas le nombre d'animaux recommandé, et avec accès sur 2 hectares de prairie.

E) Les moutons et les chèvres proviennent d'élevages aux normes.

G) Le rôle des personnes impliqués, dans le cas de ces protocoles expérimentateur, vétérinaire, animalier et responsable de l'état sanitaire des animaux, est bien défini, un contrôle plus important après chaque manipulation est également défini pour les personnes directement concernées.

H) La douleur pendant la prise de sang est une douleur légère.

10163 L'épilepsie du lobe temporal (MTLE) est la forme d'épilepsie la plus réfractaire aux traitements anti-épileptiques. En effet, cette forme d'épilepsie représente à elle seule la moitié des patients épileptiques en échec thérapeutique et inversement 90 % des patients souffrant d'une épilepsie temporale sont réfractaires aux traitements. De nouvelles stratégies thérapeutiques visent non plus à traiter l'épilepsie lorsqu'elle est diagnostiquée, mais à bloquer son hypothétique installation (épileptogénèse) suite à un événement déclencheur, tel un traumatisme lésionnel.

L'objectif de cette étude vise à évaluer sur un modèle MTLE chez la souris, si un inhibiteur du cycle cellulaire pourrait bloquer l'épileptogénèse lorsqu'il est injecté simultanément à une injection d'acide kainique générateur d'une épileptogénèse.

4 groupes de 5 souris chacun recevront soit un agent contrôle neutre, soit l'inhibiteur à 10 mg/kg, 25 mg/kg et 50 mg/kg. Ils seront sujets ensuite à 4 électroencéphalogrammes (EEG) espacés d'une semaine chacun, puis enfin euthanasiés et des analyses histologiques seront réalisées. L'hypothétique épileptogénèse sera évaluée selon l'activité EEG ainsi que les analyses histologiques.

Concernant la règle Remplacement-Réduction-Raffinement, il n'est pas envisageable d'utiliser une approche in vitro en remplacement de l'approche in vivo puisque le trait évalué correspond à la réponse mettant en jeu tout un processus physiologique intégré chez un sujet respirant. La taille des échantillons est calculée pour permettre une mise en évidence d'un quelconque effet significatif connaissant la taille de l'effet attendu dans la population parente modulée par l'expérience que nous avons du trait mesuré. Enfin, notre protocole suit des procédures standardisées soucieuses de minimiser le stress et toute souffrance des animaux avec une détermination précise des points limites. Ceci se traduit par une visite quotidienne à l'animalerie pour contrôler le bien-être des animaux, l'enrichissement des cages autant que faire se peut, le respect des normes liées aux surfaces/volumes des cages pour éviter la surpopulation ainsi que celles liées aux plages acceptables pour la température et l'hygrométrie. En cas, de poses d'électrodes cérébrales, les grilles employées sont plates pour éviter des chocs avec les électrodes ; la nourriture étant disposée à même la cage.

10164 Le nombre croissant de cas de maladie du foie gras ou stéatohépatite non-alcoolique (NASH), est étroitement corrélé à la pandémie de diabète. Mais aujourd'hui, aucun traitement n'existe pour soigner cette maladie du foie gras et les traitements antidiabétiques restent lourds pour les patients. De ce fait, l'importance de développer des modèles animaux permettant de reproduire cette maladie du foie ainsi que le diabète permettront d'identifier et de tester plus facilement des nouvelles molécules thérapeutiques.

Basé sur les résultats et les protocoles de plusieurs études scientifiques, ce projet visera à induire la maladie du foie gras et/ou du diabète chez des souris ou des rats par des agents chimiques ou par un régime alimentaire particulier. Ces modèles animaux, qui sont très couramment utilisés par la communauté scientifique, seront alors utilisés afin de tester de nouvelles molécules thérapeutiques.

Durant toutes nos procédures d'expérimentations animales (induction de la pathologie + traitements), le principe des 3R est suivie de la façon suivante :

-Remplacement : Les observations physiologiques obtenues lors de nos expérimentations ne peuvent être réalisées sur d'autres modèles expérimentaux (in vitro ou ex vivo), car elles prennent en compte l'organisme dans son ensemble et les relations inter-organes (foie, pancréas, tissu adipeux, reins). Cependant, une revue précise de la littérature sur d'autres systèmes est réalisée avant et après chaque expérimentation.

-Réduire : Basé sur notre expérience et les données publiés dans la littérature, un nombre minimal d'animaux (souris et rats) sera utilisé afin d'avoir une puissance statistique suffisante pour nos conclusions. Un nombre estimé à 7450 souris et 2000 rats sera utilisé lors de ces 5 prochaines années. Ces chiffres sont basés sur nos expériences passées avec ces modèles.

-Raffinement : Tous nos animaux sont hébergés dans des cages aux dimensions et enrichissement en accord avec la législation européenne et en nombre adapté à l'espèce. Pendant toute la durée de nos études, les animaux sont suivis quotidiennement et pesés au moins une fois par semaine afin d'identifier au plus tôt un état clinique anormal. Tout signe clinique est répertorié (tel que perte de poids, défaut de toilettage, agressivité, immobilité, etc.) et une procédure en relation avec l'état clinique est mise en œuvre afin de diminuer la souffrance des animaux. Si l'allègement de la souffrance n'est pas observé, l'animal sera exclu de l'étude et euthanasié.

10165 Le risque de mort subite chez les patients épileptiques (SUDEP) est trois fois plus élevé que chez les personnes saines. Il existe un modèle idéal de SUDEP chez la souris correspondant à une crise

épileptique induite par un stimulus sonore et possiblement suivie du décès (crise audiogène ou AGS pour « AudioGenic Seizures » en anglais). Seulement, seules quelques lignées de souris sont sensibles à la crise audiogène, et parmi elles, aucune ne présente cette propriété de façon robuste et/ou sont trop frêles pour imaginer des études expérimentales.

Pour pallier ce manque, nous avons décidé de créer par sélection génétique une lignée présentant une réponse robuste à la crise audiogène. Pour ce faire, en première étape, nous créerons une population génétiquement hétérogène issue de 4 lignées de souris répondeuses à la crise audiogène. Nous testerons 100 animaux (50 femelles et 50 mâles) issus de cette population et nous retiendrons les 10 mâles et les 10 femelles les plus sensibles à la crise audiogènes et corrélativement les moins frêles. Nous constituerons 10 couples avec ces 20 animaux qui nous permettront d'obtenir 100 nouveaux animaux descendants que nous testerons, puis nous en sélectionnerons 10 couples par le même principe. Cette procédure itérative sera appliquée 8 fois. Au final, nous testerons 800 souris.

Concernant la règle Remplacement-Réduction-Raffinement, il n'est pas envisageable d'utiliser une approche in vitro en remplacement de l'approche in vivo puisque le trait évalué correspond à la réponse mettant en jeu tout un processus physiologique intégré chez un sujet respirant. La taille des échantillons est calculée pour permettre une mise en évidence d'un quelconque effet significatif connaissant la taille de l'effet attendu dans la population parente modulée par l'expérience que nous avons du trait mesuré. Enfin, notre protocole suit des procédures standardisées soucieuses de minimiser le stress et toute souffrance des animaux avec une détermination précise des points limites. Ceci se traduit par une visite quotidienne à l'animalerie pour contrôler le bien-être des animaux, l'enrichissement des cages autant que faire se peut, le respect des normes liées aux surfaces/volumes des cages pour éviter la surpopulation ainsi que celles liées aux plages acceptables pour la température et l'hygrométrie. En cas, de poses d'électrodes cérébrales, les grilles employées sont plates pour éviter des chocs avec les électrodes ; la nourriture étant disposée à même la cage.

10166 Le lymphome à cellules natural killer est un cancer hématologique de mauvais pronostic, résistant à la plupart des chimiothérapies. Les patients développent aussi un syndrome hémophagocytaire, caractérisée par une fièvre élevée et des dysfonctions d'organes pouvant entraîner le décès du patient. Notre équipe a mis en évidence une mutation activatrice de la protéine JAK3 présente chez 20 à 35% des patients. Cette mutation est responsable d'une croissance plus importante des cellules tumorales ainsi que de la sécrétion d'une protéine appelée interféron-gamma qui pourrait participer au syndrome hémophagocytaire. Des médicaments ciblant la protéine JAK3 sont déjà commercialisés et utilisés dans d'autres maladies comme la polyarthrite rhumatoïde mais leur efficacité n'a jamais été évaluée dans le cadre du NKCL, en raison de l'absence de modèle animal de la pathologie. Pour générer un modèle de cette pathologie, nous avons mené des travaux préliminaires sur des cellules de souris portant la protéine JAK3 mutée. Ces cellules prolifèrent plus et sécrètent plus d'interféron-gamma que des lymphocytes NK normaux suggérant un rôle important de la mutation dans la genèse de la maladie. Nous souhaitons maintenant développer un modèle animal de cette maladie par injection intraveineuse des cellules portant la mutation à des souris immunodéficientes. Une fois le modèle établi, nous testerons un médicament inhibiteur de JAK3 appelé tofacitinib et l'efficacité de médicaments ciblant l'interféron-gamma. Enfin, nous évaluerons l'intérêt d'associer le tofacitinib avec la chimiothérapie conventionnelle.

Au cours de la lymphomagénèse (apparition du lymphome), les interactions avec le microenvironnement jouent un rôle crucial qu'il n'est pas possible de récapituler in vitro. Dans notre cas, les relations croisées entre les lymphocytes NK tumoraux et les macrophages jouent probablement un rôle majeur dans l'agressivité de la maladie via le développement d'un syndrome hémophagocytaire. L'utilisation d'un modèle animal est indispensable pour observer et évaluer l'importance de ces interactions dans le développement de la maladie. Par ailleurs, un modèle animal reproduisant les principales caractéristiques de la maladie humaine permettrait d'évaluer l'efficacité de nouvelles thérapeutiques, en particulier basées sur l'inhibition de JAK3 dans le cadre de tests précliniques. Ce projet est donc indispensable pour comprendre la maladie au niveau du

microenvironnement et dans le contexte d'un organisme entier, ainsi que pour tester des pistes thérapeutiques contre la maladie étudiée.

Ce projet, planifié sur une durée de 5 ans nécessitera 256 souris, espèce de référence pour le développement de modèles d'hémopathies malignes (cancers du sang). Ce nombre a été déterminé comme le minimum nécessaire pour mettre en évidence des effets statistiquement et biologiquement pertinents.

Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés dans ce projet, nous utiliserons des protocoles qui ont été discutés et élaborés afin d'utiliser un nombre optimal de souris, nécessaire et suffisant, pour des expérimentations statistiquement exploitables (calculs de puissance). De plus, seules les expériences indispensables à notre projet seront réalisées en particulier, l'efficacité des molécules inhibitrices sera d'abord testée dans les systèmes de culture *in vitro*.

Enfin, nous ferons un suivi longitudinal rigoureux par prélèvement de sang permettant de documenter au mieux l'évolution de la maladie, et de réduire le nombre d'animaux témoins. Un suivi journalier sera effectué et des fiches de bien-être animal seront établies permettant ainsi de prendre en charge toute angoisse ou inconfort. En cas de souffrance ou mal-être, des mesures spécifiques (alimentation adaptée ou analgésiques) seront prises.

Toutes les procédures seront faites sous anesthésie locale ou générale. L'environnement des animaux en groupes sociaux sera enrichi en tout temps avec des maisons en cartons et des cotons. Ces travaux nous permettront d'une part de mieux comprendre le développement du lymphome NK, d'autre part d'évaluer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

10167 La stéatohépatite est une maladie du foie liée à l'obésité, dans laquelle le foie présente un excès de gras à l'origine d'une inflammation. Cet état peut devenir irréversible et évoluer vers une cirrhose ou un cancer. Il s'agit de la cause d'hépatite la plus répandue et son origine principale est une alimentation mal équilibrée, riche en graisse et en sucre. Il existe des différences liées au sexe dans l'apparition et l'évolution de cette maladie qui sont encore mal connues. Nous proposons d'étudier le rôle de protéines impliquées dans le métabolisme des hormones sexuelles en utilisant des souris génétiquement modifiées n'exprimant pas ces protéines pour améliorer les connaissances dans ce domaine. Nous utilisons des animaux vivants car l'étude des maladies métaboliques telles que la stéatohépatite implique la nécessité d'explorer les dialogues inter-organes, impossibles à reproduire par des méthodes alternatives. Pour évaluer l'importance des facteurs d'intérêt dans notre expérience (le genre, le transgène et le régime), il est nécessaire d'utiliser des animaux mâles et femelles, transgéniques (2 transgènes différents) et leur contrôle non modifié, ainsi qu'un régime contrôle pour le comparer au régime gras et sucré, induisant la maladie. Chaque lignée transgénique possède son propre contrôle non muté, issu des mêmes parents, couramment appelé 'littermate' (issu de la même litière). Ainsi, 192 souris seront utilisées, réparties en différents groupes, un nombre suffisant et nécessaire pour obtenir des résultats interprétables de façon fiable. Des mâles et des femelles, transgéniques ou non, seront hébergées en locaux d'animalerie appropriés, leur apportant les meilleures conditions de bien-être et de santé, et recevront un régime riche en graisses et en sucre, dit "Western Diet" pendant 16 semaines, en comparaison d'animaux sous un régime standard pour souris de laboratoire. Les 16 semaines de régime permettent d'obtenir un stade précoce de maladie hépatique, non sévère vis-à-vis de la santé globale de l'animal. Un suivi hebdomadaire de la consommation calorique et hydrique, un prélèvement de sang à 8 semaines, et un test de tolérance au glucose à 12 semaines permettront d'évaluer l'évolution de la maladie. Au cours de ce test, une anesthésie cutanée sera réalisée pour limiter la douleur provoquée lors de la prise de sang. En fin d'expérience, les animaux seront euthanasiés afin de prélever du sang et des organes d'intérêts (foie, tissus adipeux et intestin) pour des explorations moléculaires et biochimiques.

10168 Le diabète de type 1, aussi appelé diabète sucré, est lié à un manque d'insuline ou à un défaut d'action de cette hormone. En effet, cette pathologie résulte en une importante perte des cellules bêta-pancréatiques qui sont les seules cellules de l'organisme pouvant produire de l'insuline. L'une des conséquences les plus dramatiques de cette pathologie est le développement de néphropathie, autrement dit de complications rénales pouvant nécessiter des dialyses ou une transplantation. Le

diabète est d'ailleurs la cause principale de pertes de fonctions rénales chez l'homme. Actuellement, les traitements pour le diabète de type 1 associent généralement un changement dans le régime alimentaire et des injections d'insuline exogène afin de réguler le glucose sanguin. Cette approche peut être inconfortable pour les patients et nous nous proposons d'explorer une autre piste. Plusieurs travaux récents semblent indiquer qu'il est possible de protéger ou de régénérer les cellules produisant de l'insuline en modulant différentes propriétés de ces cellules. Parmi ces cibles potentielles, le système endocannabinoïde (SEC) et l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) ont retenu notre attention.

Le SEC est un système biologique complexe mettant en jeu des molécules analogues à celles trouvées dans le cannabis et est impliquées dans de nombreuses fonctions physiologiques. Ce système est essentiellement composé de 2 récepteurs (CB1R et CB2R) et de 2 molécules produites par l'organisme appelées endocannabinoïdes. Notre intérêt d'étudier le SEC et les CB1R en particulier fait suite aux études montrant qu'une activation de ces récepteurs au niveau pancréatique conduit à une destruction ou une perte de fonction des cellules responsables de la production d'insuline, favorisant ainsi le développement du diabète. Inversement son blocage avec un agent pharmacologique semble partiellement corriger ces effets.

L'enzyme iNOS quant à elle semble diminuer l'action de l'insuline dans le métabolisme du glucose en produisant des quantités anormales de monoxyde d'azote pouvant stimuler les défenses immunitaires et provoquer la destruction des cellules produisant l'insuline. A nouveau, l'inhibition d'iNOS semble corriger ces aspects chez des souris génétiquement dépourvues de cette enzyme. Ainsi, notre objectif consiste à déterminer si le blocage simultané de CB1R et d'iNOS pourrait être une stratégie thérapeutique efficace pour lutter contre le diabète de type 1. Pour cela, nous disposons d'un agent pharmacologique hybride (MRI-1867) présentant la double capacité de bloquer les CB1R et d'inhiber l'activité de l'enzyme iNOS. Nous souhaitons donc tester cette molécule sur la prévention et le développement du diabète de type 1 et de ses conséquences sur les fonctions des rénales.

L'utilisation du modèle animal (souris) s'impose dans ce projet d'une part du fait de l'absence d'outils pharmacologiques validés par l'agence européenne des médicaments (EMA) qui auraient pu permettre la mise en place d'une étude clinique et d'autre part par le besoin d'analyser les mécanismes fondamentaux impliqués dans cette pathologie multifactorielle. De plus, Il n'est pas possible d'étudier tous ces aspects et mécanismes impliquant des échanges entre les organes en se limitant à des approches in vitro.

Ainsi, nous utiliserons 270 souris C57BL6J mâles adultes qui seront soumises soit à des injections de tampon acétate(véhicule) soit à des injections de streptozotocine (45 mg/kg) afin d'induire un diabète de type 1. Les souris diabétiques seront alors divisées en 2 groupes, le premier sera traité quotidiennement par gavage avec la molécule MRI-1867) et le 2ème groupe recevra un placebo dans les mêmes conditions. Nous utiliserons des souris mâles, car il est connu que les souris femelles sont moins susceptibles de développer un diabète suite à une injection de streptozotocine. Le diabète de type 1 pouvant conduire à un risque accru de déshydratation et d'hypothermie, nous opérerons un suivi quotidien des animaux afin de détecter tout dommage imprévu et ainsi intervenir pour soulager/abrèger toute souffrance. Ainsi, les cages seront posées sur des tapis chauffant afin de prévenir l'hypothermie. De même, les souris diabétiques développeront une polyurie marquée, nécessitant un changement de litière plus fréquent. Pour enrichir le milieu, tous les animaux auront à leur disposition des carrés de cellulose, une maisonnette et des bâtons à ronger. Enfin, le nombre d'animaux utilisé a été réduit au minimum requis pour obtenir des résultats statistiquement interprétables et atteindre l'objectif scientifique du projet. Nous avons également limité au maximum l'utilisation d'animaux pour les études mécanistiques en complétant cette approche par l'utilisation d'une approche in vitro sur différentes lignées cellulaires de cellules bêta pancréatiques ou de cellules rénales. En outre, le jour de chaque expérimentation, les souris seront manipulées par des expérimentateurs titulaires du niveau B.

D'autre part, bien que notre intérêt principal concerne les fonctions pancréatiques et rénales, nous nous efforceront de collecter tous les autres tissus potentiellement impactés par l'élévation chronique du glucose sanguin comme le cerveau, les muscles, le foie ou encore les différents tissus adipeux. Cela nous permettra de mettre en place une banque d'organes et ainsi de mutualiser les

échantillons afin de réduire le nombre d'animaux nécessaire pour de futurs projets ou des projets collaboratifs.

Nous espérons que ces travaux permettront de mieux comprendre les interactions entre le SEC et iNOS dans les perturbations métaboliques associées au diabète de type 1. Nous pensons que ce projet pourrait conduire à l'élaboration de futures stratégies thérapeutiques pour le traitement de cette pathologie.

10169 Le cancer de l'enfant représente moins de 1% de l'ensemble des cancers mais constitue, avant l'âge de 15 ans, la première cause de décès par maladie. La survie des enfants après le traitement de leur cancer s'est considérablement améliorée depuis les trente dernières années. Cependant, l'augmentation de l'efficacité des traitements s'accompagne d'une augmentation de leur toxicité, les gonades constituant une cible de choix de cette toxicité, le testicule étant plus vulnérable que l'ovaire. La préservation de la fertilité doit être intégrée dans la prise en charge thérapeutique des cancers de l'enfant. Le traitement médical de protection, avec pour objectif une inhibition de l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique, n'a à ce jour pas prouvé son efficacité dans la protection de la spermatogenèse humaine.

La préservation de la fertilité dans le cadre d'un traitement fortement gonadotoxique est actuellement possible pour les hommes pubères et pour les femmes qu'elles soient pubères ou pré pubères. Dans le cas d'hommes pubères, il est proposé depuis de nombreuses années la congélation de spermatozoïdes en vue d'une utilisation ultérieure en Assistance Médicale à la Procréation. Concernant les femmes, il est possible de cryoconserver le tissu ovarien soit dans le but de réaliser une folliculogenèse in vitro, soit de pratiquer une greffe autologue après guérison. Chez le garçon pré pubère, la seule solution potentielle de préservation de la fertilité conduit au prélèvement chirurgical d'un fragment testiculaire et à la congélation de ce tissu immature contenant les spermatogonies souches. Ce tissu pourra être utilisé afin d'achever la spermatogenèse soit par maturation in vitro, soit par transplantation de cellules germinales ou encore après greffe de fragments testiculaires.

L'utilisation du tissu testiculaire immature peut s'envisager selon différentes modalités : par maturation in vitro de spermatogonies souches, par maturation in vivo, chez le patient guéri, des spermatogonies souches après transplantation autologue/allogreffe et éventuellement par maturation in vivo chez l'animal des spermatogonies souches après xénotransplantation ou xéno greffe. La maturation in vitro évite la réintroduction de cellules cancéreuses. Ainsi la maturation in vitro après décongélation du tissu testiculaire pré pubère est un préalable indispensable en vue d'une application humaine chez le garçon pré pubère. De plus, une étude récente a montré, pour la première fois, l'achèvement complet de la spermatogenèse in vitro à partir de fragments testiculaires de souriceaux immatures. L'étude a consisté en l'utilisation d'un système de culture organotypique sur gel d'agarose, dont le milieu de culture contenait un composant clé pour le déroulement de la spermatogenèse ; le KSR (Knock out Serum Replacement), habituellement utilisé pour les cultures de cellules embryonnaires souches, afin de promouvoir leur prolifération tout en les gardant dans un état indifférencié. Les travaux récents de notre équipe, confirment cette possibilité d'obtenir une spermatogenèse complète à partir du tissu testiculaire pré pubère de souris frais ou congelé, en culture organotypique en gel d'agarose. Cependant, il apparaît indispensable de vérifier si les spermatozoïdes produits in vitro sont capables de féconder des ovocytes et de permettre un développement embryonnaire normal permettant l'obtention de nouveaux nés normaux, viables et fertiles à l'âge adulte. L'objectif de notre étude est donc de comparer les taux de fécondation, de développement embryonnaire, la qualité des embryons obtenus, le taux d'implantation des embryons, le nombre de nouveaux nés obtenus par Injection IntraCytoplasmique de Spermatozoïde (ICSI) par utilisation de spermatozoïdes obtenus de mâles fertiles ou issus de la maturation in vitro à partir du tissu testiculaire pré pubère frais ou décongelé (congélation lente ou vitrification). Les souris ainsi obtenues seront évaluées également sur la présence ou non de malformations et leur fertilité. Ce projet nécessite l'utilisation de 176 animaux, nous effectuerons le minimum de répliquât requis. Au cours de ces travaux tout sera mis en place dans le but de respecter « la règle des 3R » afin d'assurer le bien-être des animaux. Pour cela, certains animaux seront réutilisés lorsque cela

sera possible. Egalement, les cages des animaux seront enrichies et surveillé quotidiennement afin d'observer tout comportement pouvant traduire d'une souffrance.

10170 La castration des jeunes chevaux mâles est classiquement réalisée en pratique vétérinaire tant sur des chevaux de loisir que sur les chevaux de sport. Cette chirurgie vise à faciliter l'élevage de ces groupes d'animaux en diminuant l'agressivité, la nervosité et la sensibilité aux femelles en chaleur. Elle permet donc pour ces animaux d'avoir un tempérament plus calme et de façon constante sur l'année. Leur dangerosité éventuelle en est autant diminuée.

Cette pratique a connu des évolutions ces dernières décennies notamment par l'amélioration des techniques chirurgicales, plus sûres, et par la prise en compte de la douleur, traitée désormais par des médications appropriées.

Cependant, la castration d'un cheval pré-pubère de 300 à 500 kg représente encore des risques tant pour l'homme (accidents à la contention) que pour l'animal lui-même : risques anesthésiques, risques de lésions lors de la chute au sol, risque hémorragique et infectieux post opératoire, risque d'éventration.

De nombreuses études ont montré la facilité de réalisation des castrations précoces chez les carnivores domestiques (chiens, chats) et leur absence d'effets secondaires notamment sur la croissance et le développement général. Des effets positifs ont même été montrés comme par exemple le moindre risque de développer des tumeurs mammaires chez les femelles.

Notre objectif est d'étudier l'effet de la castration précoce chez le cheval et les effets sur la croissance notamment osseuse en comparant des poulains castrés dès la première semaine de vie à des poulains castrés à 18 mois. Un suivi sera fait dans le temps pour évaluer la croissance corporelle et osseuse et le tempérament.

Le principe des 3 R a été mûrement réfléchi :

- Remplacement : nous ne pouvons-nous dispenser d'une étude sur l'animal pour ce projet étant donné tous les mécanismes physiologiques complexes mis en cause. En outre, il nous semble indispensable de faire cette étude pour faciliter l'élevage des chevaux de loisir ou de sport, diminuer le risque de la chirurgie et améliorer le tempérament de chevaux destinés à l'utilisation de loisir notamment par des enfants.

- Réduction : les animaux castrés dans ce projet sont tous des animaux qui auraient été castrés classiquement dans leur élevage. Nous ne rajoutons donc pas de procédure sur l'animal par rapport à un élevage classique. Le nombre d'animaux total soit 22 animaux nous permettront de collecter suffisamment de données quant à la croissance ou au tempérament de ces deux lots. Nous avons pu générer des frères génétiques des premiers poulains nés (même père, même mère) ; il nous paraît important d'inclure ces frères dans notre étude, raison pour laquelle nous avons dû augmenter notre nombre d'animaux à 22 poulains au lieu de 20 initialement. Ce nombre d'animaux nous permettra de collecter suffisamment de données quant à la croissance ou au tempérament de ces deux lots.

- Raffinement : les animaux sont hébergés en groupes sociaux stables, en stabulation spacieuse en hiver et au pré en été. La chirurgie est réalisée sous anesthésie générale aux deux âges, anesthésie complétée par des traitements contre la douleur adaptés (anesthésie locale, morphiniques, anti-inflammatoires). Les animaux seront manipulés dans le calme, par leurs soigneurs habituels et opérés dans les locaux de l'élevage pour éviter tout stress de déplacement. Des apprentissages seront réalisés pour faciliter les examens au cours du projet (renforcement positif par récompense).

10171 En raison de l'abondance croissante de nourriture, le régime occidental est constitué de presque 40 % de graisses, conduisant ainsi à consommation calorique quotidienne de plus en plus élevée qui contribue grandement à l'augmentation de la fréquence de l'obésité et d'autres pathologies comme le diabète de type 2. En effet il existe une attirance spontanée de l'homme pour les aliments riches en graisses et actuellement il est clairement établi que le goût du gras représente une sixième modalité gustative. Des études récentes effectuées chez l'homme comme chez la souris indiquent que l'obésité est associée à une altération du goût avec une préférence élevée pour les corps gras. Un grand nombre des industries médico-alimentaires se sont engagées dans la conception des

stratégies pour lutter contre la surconsommation lipidique afin d'apporter des solutions durables à l'obésité. Les récepteurs de lipides (CD36 et GPR120) exprimés dans les papilles gustatives sont responsables non seulement de la perception lipidique mais également du renforcement de la préférence alimentaire pour les repas riches en gras. Ainsi ces deux lipido-récepteurs pourraient représenter la cible pour développer de nouvelles molécules (agoniste / antagoniste) permettant de moduler le comportement alimentaire lipidique chez les obèses. Dans le but de réduire la prise alimentaire des aliments gras, nous avons synthétisé de faux lipides, à partir de d'acides gras naturels, capables d'interagir avec les lipido-récepteurs mimant le goût du gras sans apporter de calories car ils ne sont pas métabolisables. Nous avons démontré l'absence d'effets génotoxiques et tératogènes de ces faux lipides. L'objectif de cette étude est d'évaluer l'effet de nos molécules « faux lipides » sur la préférence des aliments gras, la prise alimentaire et l'incidence de l'obésité dans deux modèles d'obésité chez la souris : 1) modèle d'obésité induite par un régime hyper-gras à base 32% d'huile de palme chez souris C57/Bl6 wt 2) souris génétiquement obèses « B6.V-Lep ob/ob JRj B6 ». Pour les investigations de mécanistique d'action des faux lipides, nous essayerons de confirmer l'implication de signalisation calcique par l'utilisation de souris déficientes en canaux calciques capacitifs (souris TRPC3 KO).

- L'utilisation du modèle animal (souris) s'impose dans ce projet d'une part du fait que nos molécules « faux lipides » sont nouvelles et par conséquent il n'existe aucun outil pharmacologique qui auraient pu permettre la mise en place d'une étude clinique et d'autre part par le besoin d'analyser les mécanismes multifactoriels impliqués dans l'obésité. De plus, malgré les résultats obtenus par approche in vitro utilisant des cellules gustatives, Il n'est pas possible de se limiter à des approches in vitro pour étudier les effets anti-obésité de faux lipides.

Ainsi, nous utiliserons 150 souris mâles âgées de 4 à 6 semaines qui seront soumises soit à un régime alimentaire standard, soit à un régime alimentaire enrichi en graisses (contenant 32% d'huile de palme) afin d'induire une obésité. Nous utiliserons des souris mâles, car il est connu que les souris femelles sont moins susceptibles de développer une obésité suite à un régime riche en gras. Dans un souci de réduction et en respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrit au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R », les souris femelles issues des croisements de souris TRPC3KO pourront être utilisées pour approfondir les études mécanistiques sur culture primaire de papilles gustatives. De plus, les souris auront à leur disposition divers éléments de raffinements et seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs ou le personnel qualifié des animaleries. Enfin, le nombre d'animaux utilisé a été réduit au minimum requis pour obtenir des résultats statistiquement interprétables et atteindre l'objectif scientifique du projet. Nous avons développé une lignée de cellules gustatives de souris qui permet de réaliser les études mécanistiques et ainsi limiter au maximum l'utilisation d'animaux.

Ce projet nous permettra de valider la modulation des récepteurs lipidiques linguales par les faux lipides chez la souris et de déterminer si ces molécules réduisent l'incidence de l'obésité et améliorent les perturbations du métabolisme des graisses associées à l'obésité. Nous espérons que ce projet puisse conduire à l'élaboration de futures stratégies thérapeutiques ou nutritionnelles pour le traitement de l'obésité.

10172 La bactérie *Staphylococcus aureus* est responsable d'un large panel d'infections plus ou moins sévères, liées en partie à l'expression de nombreux facteurs de virulence. Depuis longtemps la régulation de l'expression de ces facteurs de virulence est un sujet de recherche. Par des tests in vitro, il a été montré que la protéine S1 de *S. aureus* était un régulateur majeur de l'expression de certaines toxines. En comparant les souches sauvage, délétée pour le gène codant S1 ou surexprimant la protéine S1, il a été démontré que la présence de S1 potentialise fortement l'expression des psm alpha, des hémolysines alpha et gamma et ainsi augmente la cytotoxicité des surnageants bactériens vis à vis des cellules eucaryotes. Toutes ces résultats tendent à montrer que la protéine S1 pourrait être un facteur de virulence majeur de *S. aureus*. Ces résultats doivent être confortées en démontrant le rôle de la protéine S1 dans la virulence in vivo.

Pour cela, nous avons choisi d'utiliser le modèle d'infection intrapéritonéale chez la souris, qui est un très bon modèle pour étudier l'impact des toxines. Nous nous basons sur un protocole expérimental déjà maîtrisé sur des souris femelles BALB/c. Pour chaque expérience, nous avons le

souci permanent d'utiliser un nombre minimum d'animaux tout en ayant le maximum de chance d'obtenir des résultats statistiquement significatifs. Nous aurons besoin de 206 souris pour ce projet. L'utilisation d'animaux est essentielle pour la réalisation du présent projet et la souris reste un modèle adapté aux types de recherche envisagés, en effet l'utilisation d'un modèle animal est essentiel pour démontrer le rôle de la protéine S1 dans la virulence de staphylococcus aureus, au sein d'un organisme complexe, en tenant compte des interactions hôte-pathogène et la présence d'un système immunitaire. Lors des procédures expérimentales, tout animal montrant une prostration, des poids hérissés ou une absence de toilettage, ou une température inférieure à 35°C sera immédiatement euthanasié.

10173 Le mélanome est un cancer de la peau difficile à traiter du fait de sa capacité à former des métastases et sa résistance aux traitements. En 2017, l'incidence mondiale chez la femme était de 13.6/100000 et chez l'homme de 14.9/100000. En France, cela correspond à plus de 15000 cas de diagnostiqués, avec plus de 1700 décès annuels associés. La prise en charge du mélanome au stade métastatique a connu d'importants progrès grâce aux thérapies ciblées et aux immunothérapies. Cependant, ces traitements sont limités à des sous-groupes de patients et les rechutes sont fréquentes. Globalement, plus de 50% des patients ont besoin de traitements supplémentaires, justifiant le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. La voie de protéasome et les enzymes impliquées dans l'ubiquitination des protéines constituent la machinerie nécessaire pour éliminer les protéines endommagées et non nécessaires pour la cellule. Ce système joue un rôle important dans de nombreuses pathologies comme le cancer et d'après nos résultats in vitro les composés ciblant le protéasome et certains enzymes de déubiquitination (déubiquitinases) déclenchent des changements moléculaires associés à la mort cellulaire immunogénique, un type de mort cellulaire qui déclenche la réponse des cellules T anti-tumorales. Cibler la voie du protéasome représente donc une stratégie prometteuse contre les mélanomes. Dans un effort de remplacement, nous avons réalisé un certain nombre d'expériences in vitro. Compte tenu de la complexité du microenvironnement tumoral, il est nécessaire de confirmer ces résultats in vivo dans des modèles précliniques de développement du mélanome chez la souris. Ces études seront réalisées dans le souci d'utiliser un nombre minimum d'animaux (1260 animaux pour toutes les procédures) sans compromettre les objectifs du projet et en tenant compte des exigences de remplacement, de réduction et de raffinement. Le nombre d'animaux nécessaires au projet a été calculé au plus juste afin d'obtenir des résultats statistiquement exploitables en utilisant le logiciel d'analyse G.Power. En ce qui concerne le principe de raffinement, nous aurons recours à des techniques d'imagerie non invasive pour le suivi longitudinal des animaux. Pour l'ensemble des procédures, les souris seront euthanasiées si leurs tumeurs atteignent la taille de 1cm³ ou si elles perdent plus de 10% de leur poids de départ. Tout changement de comportement (souris isolée), modification physique (courbure du dos, aspect de la peau) ou signes de douleur conduira à son euthanasie avant la fin de la procédure. Pour réduire l'angoisse des animaux, nous hébergerons 5 souris/cage dans des conditions enrichies d'élevage (igloo en polycarbonate et une tigelette en papier irradié pour permettre la nidification). De plus, leur bien-être sera scrupuleusement pris en compte dans toutes les procédures en terme de conditions d'élevage (température, hygrométrie), d'hébergement enrichi et de soins afin de réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les animaux. Nos travaux devraient permettre de mieux comprendre les processus responsables du développement métastatique et de l'échappement au traitement des mélanomes et pourraient à terme permettre d'identifier de nouvelles pistes thérapeutiques.

10174 Les glioblastomes sont les tumeurs primitives du cerveau les plus fréquentes chez l'adulte. Les traitements incluant la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie sont peu efficaces et ces tumeurs demeurent incurables, avec une médiane de survie inférieure à 18 mois. Il est aujourd'hui admis que les cellules souches de gliomes (CiGs) sont responsables du développement de la tumeur et des récurrences. Fortement hétérogènes, les glioblastomes se composent d'une part, de territoires enrichis en cellules souches qui se multiplient activement et

sont insensibles aux traitements, et d'autre part de zones différenciées, non proliférantes et sensibles aux chimiothérapies. Notre objectif est de contribuer à l'élaboration de nouvelles thérapies anti-cancéreuses en induisant la différenciation des CiGs et leur sensibilisation aux chimiothérapies conventionnelles. Pour cela, nous avons criblé une collection de composés chimiques isolés de substances naturelles in vitro puis dans des modèles 3D substitutifs qui permettent de réduire le nombre de sujets utiles lors de la phase d'expérimentation animale. Ainsi, nous avons identifié un composé, le NAV, présentant un intérêt thérapeutique réel puisqu'il est actif sur des cellules résistantes au TMZ, la chimiothérapie de référence pour le traitement des glioblastomes. Les tests de toxicité ont montré qu'une injection IV à 10mg/kg ainsi qu'une IP par jour pendant cinq jours à 20mg/kg n'induisent aucune toxicité chez la souris. Ce nouveau programme a pour objectif de tester l'effet anti tumoral du NAV en IP sur le développement du glioblastome chez la souris.

Dans cette perspective, des CiGs luminescentes contrôles et résistantes au TMZ, seront greffées dans le cerveau (striatum droit) de souris nude femelles de 8 semaines. Le développement tumoral sera suivi à l'aide d'un dispositif d'imagerie qui permet de réduire sensiblement le nombre d'animaux sans affecter la quantité de mesures. Une fois le greffon installé, les animaux recevront une injection intra péritonéale de NAV trois fois par semaine. L'impact de ce traitement sur la croissance de la tumeur sera suivi par imagerie et comparé à un groupe contrôle qui recevra, à la même fréquence, une injection de sérum physiologique. Les animaux seront maintenus vivants jusqu'au terme de l'expérience (52 semaines) ou l'apparition du point limite établi selon une grille de score garantissant la prévention de la souffrance animale. Nous testerons l'effet de trois concentrations de NAV et une solution saline contrôle sur deux cultures de CiGs, dont l'une a été sélectionnée in vitro pour sa résistance au TMZ. Dans ces différents groupes, le traitement sera administré soit une semaine après l'implantation du greffon soit lorsque la tumeur se sera développée (environ un mois environ après l'implantation).

Les hypothèses statistiques que nous avons formulées pour obtenir des résultats significatifs indiquent que 10 animaux seront nécessaires par condition expérimentale. Au total, ce projet nécessitera (3 concentrations NAV + 1 solution saline) x 2 types cellulaires (CiGs et CiGs résistantes au TMZ) x 2 modes de traitement (immédiat/récidive et décalé/curatif) x 10 souris = 160 souris qui seront hébergées par trois ou quatre dans des cages comportant des matériaux propices à augmenter leur bien-être en leur permettant d'exercer les activités spécifiques à leur espèce. Les résultats permettront de déterminer si le NAV peut inhiber la croissance de tumeurs gliales après un traitement par voie intra péritonéale.

Dans la conception de notre projet nous avons attaché un soin particulier au respect de la règle des 3R en :

- Remplaçant autant que possible le recours aux animaux par le développement de tests sur cultures cellulaires ainsi que dans deux modèles tridimensionnels organotypiques substitutifs mimant l'interaction des cellules cancéreuses avec un tissu cérébral sain.
- Réduisant l'effectif au nombre de sujets strictement nécessaires à l'expérience par la recherche du meilleur compromis entre la grandeur de l'effet recherché et la puissance expérimentale ainsi que par l'utilisation d'un dispositif d'imagerie du petit animal qui assure un suivi longitudinal de la croissance tumorale sans euthanasier d'animal à chaque point de mesure.
- Raffinant les conditions expérimentales par la mise en œuvre d'une prémédication préopératoire systématique garantissant la prévention de la douleur per et post opératoires ainsi qu'en adaptant la grille d'évaluation du bien-être animal aux spécificités du développement des tumeurs cérébrales. De plus, nous avons déterminé des points limites basés sur des critères biologiques (variation et seuil de bioluminescence corrélée à la croissance tumorale) qui permettent d'anticiper les signes cliniques.

Ces expériences sont une nouvelle étape du développement préclinique du candidat médicament. De plus, l'étude du mécanisme d'action de ce composé éclairera sur les mécanismes moléculaires de la biogenèse du glioblastome, encore très peu connus.

10175 Notre équipe de recherche étudie depuis plus de 10 ans la thrombose notamment grâce un modèle préclinique in vivo qui permet de visualiser tous les acteurs intervenant dans la thrombose après blessure en temps réel par microscopie intravitale. Dans le cadre de notre activité de plateforme

nous sommes amenés à tester des antiplaquettaires qui ne sont pas encore commercialisés et à les comparer à des antiplaquettaires déjà commercialisés dans notre modèle préclinique de thrombose. La majorité des prescriptions des antiplaquettaires le sont pour prévenir les risques élevés de thrombose chez les patients atteints de syndromes coronariens aigus. Les antiplaquettaires tel que le clopidogrel, le cangrelor ou encore le ticagrelor ont pour cible un récepteur purinergique nommé P2RY12. Ce récepteur à sept domaines transmembranaires est un récepteur purinergique à ADP qui est couplé à une petite protéine G de type i. Ce récepteur est décrit dans la littérature pour être exclusivement exprimé à la surface des plaquettes et des cellules microgliales. Pour une compagnie internationale, nous avons déterminé les profils thrombotiques de différentes molécules non commercialisées dans notre modèle préclinique. Deux de ces molécules présentent un profil différent des autres et nous souhaitons comparer les mécanismes d'actions in vivo aux autres molécules déjà sur le marché. Pour cela nous souhaitons étudier le comportement de ces différentes drogues qui sont connues pour se lier au récepteur P2RY12 de manière irréversible (Clopidogrel, Z) ou réversible (Ticagrelor, Cangrelor, X) sur des animaux n'exprimant pas le récepteur P2RY12. En effet certaines drogues qui sont actuellement sur le marché présentent des effets hors cibles supplémentaires notamment sur l'adénosine pour le Ticagrelor et sur le récepteur P2RY13 pour le Cangrelor. L'utilisation de ces animaux déficients en P2RY12 nous permettra d'identifier si les molécules testées non commerciales sont également capables de développer des effets hors cibles dans l'animal vivant en présence de tous les partenaires cellulaires et moléculaires participant à la formation d'un thrombus artériel. Cela nous permettra d'évaluer le rapport bénéfice risque (baisse de la capacité de thrombose/ augmentation du saignement) de ces effets hors cibles potentiels.

Dans le but de respecter la règle des 3R, les souris sont hébergées par groupe de 5 avec comme enrichissement du coton pour nidification ou des dômes. La totalité des expérimentations sera effectuée par du personnel compétant. Les expérimentations de microscopie intravivante sont des expérimentations sans réveil, et sont réalisées sous anesthésie générale injectable (ketamine /Xylazine/atropine). Les animaux sont maintenus sous anesthésie profonde durant toute l'expérimentation puis euthanasiés par un excès d'anesthésique. Le nombre de souris a été calculé au plus juste pour obtenir une différence significative. Dans un souci d'utilisation d'un nombre minimal d'animaux, le nombre total d'animaux annoncé (569 : 537 animaux déficients en P2RY12 et 32 animaux C57bl6) pourra ne pas être atteint sur les 5 ans du projet. En effet si une différence significative est obtenue entre les différents groupes expérimentaux avant l'utilisation de la totalité des animaux, certains animaux annoncés ne seront pas utilisés.

10176 Notre projet propose d'étudier les effets de la relaxine-3 et de son récepteur RXFP3 dans le contrôle de la sensibilisation nociceptive. Ce peptide influence un grand nombre de fonctions physiologiques comme le comportement alimentaire, le métabolisme et l'anxiété.

Nous avons montré lors d'expériences précédentes chez la souris que l'injection intracérébrale au niveau du ventricule latéral d'un agoniste de la relaxine avait des effets analgésiques significatifs. Ces résultats intéressants nous conduisent à explorer les aires cérébrales précises qui répondent à la mise en jeu du système relaxine-3/RXFP3 chez des animaux soumis à une douleur inflammatoire après injection intra-plantaire de l'adjuvant de Freund. Il s'agit d'un modèle d'études couramment utilisé au sein de notre équipe et dans le monde. Pour répondre à notre objectif, (1) nous testerons dans un premier temps 6 aires cérébrales différentes, toutes impliquées dans le contrôle de la transmission nociceptive. Pour cela, nous injecterons l'agoniste de la relaxine et nous explorerons les modifications comportementales, et en particulier les seuils de réponse à une stimulation périphérique. (2) Lorsque des effets seront détectés, nous en validerons la spécificité par une co-injection des antagonistes de la relaxine.

Ce projet respecte la règle des 3R. Pour le R de Raffiner, tous les protocoles sont optimisés pour soulager le stress et la douleur des animaux et dans les procédures où cela sera possible, un antalgique sera donné. La chirurgie stéréotaxique est réalisée sous anesthésie générale avec une couverture antalgique (Lidocaine et buprenorphine) qui permettra une limitation de la douleur pendant et après le réveil de l'animal. Les animaux seront surveillés quotidiennement par les expérimentateurs avec une surveillance renforcée après la chirurgie avec la mise en place d'une

réhydratation, un réchauffement, des traitements vétérinaires si besoin. Des points limites sont définis pour éviter la souffrance des animaux. Les animaux de cette procédure feront l'objet d'une surveillance quotidienne renforcée, et les points limites définis permettront de maîtriser la douleur. Pour le R de Remplacer, le recours au modèle animal est indispensable car ce projet demande une évaluation comportementale et aucun modèle in vitro (cellules ou tissus) ne peut reproduire les conditions des pathologies étudiées.

La réduction du nombre d'animaux (R de réduire) est prise en compte tout en conservant une signification scientifique statistique qui tient compte de l'hétérogénéité inter-individuelle, et du taux de succès de l'implantation des canules dans la structure cible. Le nombre de souris utilisé dans chacun des groupes expérimentaux ne dépassera pas ainsi 10 (partie 1) ou 15 (partie 2) animaux par groupe selon les conditions. La réalisation de ce projet dans son ensemble nécessite au total l'utilisation de 240 souris de type C57Bl/6J.

10177 Le diabète et l'hypothyroïdisme sont deux problèmes majeurs de santé publique, touchant chacun plus de 3 millions de la population française. Ces pathologies endocriniennes ont des conséquences graves sur le métabolisme, et peuvent être parfois liées. Le pancréas endocrine est composé d'îlots de cellules capables de réguler la glycémie sanguine. Le diabète résulte d'un défaut de fonctionnement des cellules bêta des îlots pancréatiques, productrices d'insuline. Durant le développement fœtal, l'environnement métabolique joue un rôle essentiel dans l'établissement d'une masse de cellules bêta fonctionnelle. Une modification du milieu intra-utérin induisant une altération du développement des cellules bêta constitue un facteur de risque de diabète de type 2 (DT2) à l'âge adulte. Les perturbations hormonales chez la mère, liées à la gestation, sont capables d'altérer le développement du pancréas. En particulier, la gestation induit une modification de la fonction thyroïdienne et on estime que 0.5 % des femmes enceintes présentent une hypothyroïdie. Malgré l'importance des hormones thyroïdiennes dans le développement du fœtus et du pancréas endocrine, l'impact d'une hypothyroïdie maternelle sur la prédisposition au DT2 chez les descendants reste à élucider. Objectif : Le but de ce projet est de comprendre les conséquences d'une hypothyroïdie maternelle induite par régime déficient en iode chez la souris pendant la gestation sur la fonction des cellules bêta pancréatiques et la prédisposition au DT2 chez la descendance à l'âge adulte. Méthode : Pour cela, nous étudierons les paramètres métaboliques, la maturité des cellules bêta et la fonctionnalité des îlots chez les descendants par microscopie de fluorescence et imagerie calcique. De plus, nous évaluerons la prédisposition des descendants au DT2 spontané ou suite à un traitement par régime gras. Cela nous permettra de déterminer le rôle d'une carence en hormones thyroïdiennes chez la mère durant la gestation dans la fonctionnalité des cellules bêta et dans la prédisposition au développement du DT2, pouvant avoir des conséquences pour la prévention de la maladie.

Il n'existe malheureusement aucune méthode alternative à l'expérimentation animale pour répondre à ces objectifs ; la complexité d'une réponse dans un tissu suite à un stress métabolique ne pouvant être reproduite in vitro. Nous avons néanmoins effectué des calculs statistiques nous permettant de prédire le nombre d'animaux nécessaire pour obtenir nos résultats, et tout est mis en œuvre pour réduire le nombre d'animaux utilisé à son minimum (152 souris). Les souris sont hébergées dans des milieux enrichis (copeaux pour créer des nids, abris, tunnels), et nos animaux sont suivis quotidiennement pour détecter tout symptôme inattendu, en minimiser les conséquences (administration de soins), et prévenir toute douleur ou souffrance. Le cas échéant, l'expérimentation serait immédiatement interrompue.

10178 L'étude décrite dans le présent dossier sera réalisée dans le cadre d'une prestation contractuelle pour le compte d'un client qui souhaite tester l'impact de 3 composés X, Y et Z sur la synthèse protéique au niveau musculaire chez la souris âgée. Ces composés sont développés principalement dans le but de traiter ou de prévenir les conditions liées à l'âge et notamment la fonte musculaire. Les composés seront administrés par le biais de la nourriture pendant 6 semaines à des souris sauvages âgées de 21 mois. Les groupes expérimentaux seront formés après une mesure de composition corporelle et un test de performance réalisé sur tapis roulant de façon à obtenir des groupes homogènes du point de vue de leur niveau de masse maigre et de leurs performances

physiques. De l'eau lourde sera mise à disposition des animaux pendant la dernière semaine, afin de permettre le suivi de la synthèse protéique musculaire au cours de cette période. La prise alimentaire et la prise hydrique individuelles seront mesurés une fois par semaine afin d'être en mesure de quantifier les doses de composés et d'eau lourde effectivement consommées par les animaux au cours de l'étude. En fin d'étude, avant euthanasie, une nouvelle mesure de composition corporelle sera réalisée et une moitié des animaux subiront un test de performance sur tapis roulant alors que l'autre moitié restera sédentaire.

A l'issue du protocole, les animaux seront anesthésiés et un prélèvement sanguin sera pratiqué par ponction cardiaque avant euthanasie. Les muscles quadriceps et gastrocnémiens ainsi que le foie et le cœur seront collectés pour des analyses ultérieures.

Pour cette étude, un total de 96 souris sera utilisé, divisée en 8 groupes expérimentaux :

4 Groupes non sédentaires (Test de performance avant euthanasie) :

- Groupe 1 : Alimentation standard/non sédentaires (Contrôles ns; n=12)
- Groupe 2 : Alimentation enrichie avec le Composé X/non sédentaires (n=12)
- Groupe 3 : Alimentation enrichie avec le Composé Y/non sédentaires (n=12)
- Groupe 4 : Alimentation enrichie avec le Composé Z/non sédentaires (n=12)

4 Groupes sédentaires (Pas de test de performance avant euthanasie) :

- Groupe 5 : Alimentation standard/sédentaires (Contrôles s; n=12)
- Groupe 6 : Alimentation enrichie avec le Composé X/sédentaires (n=12)
- Groupe 7 : Alimentation enrichie avec le Composé Y/sédentaires (n=12)
- Groupe 8 : Alimentation enrichie avec le Composé Z/sédentaires (n=12)

La règle des 3Rs a été prise en compte dans l'élaboration du présent protocole :

- Raffinement : Le protocole a été planifié de façon à limiter au maximum tout stress et tout inconfort pour les animaux. Les animaux seront hébergés en cages ventilées individuelles (nécessité de mesurer les prises alimentaire et hydrique individuelles) et un enrichissement du milieu sera assuré par l'ajout de maisons dôme. L'administration des composés via la nourriture limite fortement la manipulation des animaux et permet de s'affranchir de toute procédure d'administration invasive. Les mesures de composition corporelle se feront chez l'animal vigile avec des temps de mesure de l'ordre de 1 minute. L'ensemble des prélèvements terminaux seront réalisés sous anesthésie (sang) ou post-mortem (organes). Par ailleurs, bien que le protocole soit très peu invasif, un suivi journalier des animaux permettra une action rapide en cas d'atteinte des points limites établis.

- Réduction : Le nombre d'animaux utilisés par groupe (n=12) a été défini comme le nombre minimum nécessaire pour être en mesure de mettre en évidence une différence statistiquement significative sur les paramètres étudiés.

- Remplacement : 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'efficacité réelle d'un composé sur la synthèse protéique au niveau musculaire.

10179 Les cardiopathies ischémiques sont la première cause de mortalité dans le monde et représentent environ 9 millions de mort par an. Une étude clinique récente montre que la survie de ces patients n'a pas été amélioré entre 1998 et 2012, pour cause la complexité du développement de la cardiopathie et les nombreuses comorbidités qui lui sont associées. Les comorbidités les plus fréquentes, retrouvées chez la moitié des patients ischémiques sont les troubles respiratoires du sommeil (TRS), ces patients montrent une mortalité accrue. Les patients atteints de TRS présentent des apnées répétées pendant le sommeil : on parle d'hypoxie intermittente (HI). Nous avons précédemment montré que l'HI est délétère sur la cardiopathie ischémique et induit une hyperactivité sympathique.

Ainsi l'objectif de ce projet est de caractériser les effets de l'activité sympathique sur l'aggravation de la cardiopathie ischémique induite par l'HI, sur le remodelage ventriculaire, la dysfonction contractile et les perturbations de l'homéostasie calcique, dans un modèle de cardiopathie ischémique chez le rat. Cette étude nous permettra d'envisager un diagnostic et un traitement spécifique de ces patients souffrant de TRS et d'une cardiopathie ischémique en ciblant particulièrement l'activité sympathique cardiaque.

Nous utiliserons ainsi 106 rats présentant une cardiopathie ischémique. Celle-ci sera réalisée par ligature permanente de l'artère coronaire gauche. Les rats seront alors divisés en 2 groupes, avec dénervation cardiaque ou pas, puis exposés à l'HI ou à la normoxie pendant 6 ou 12 semaines. A 6 semaines le focus sera fait sur l'étude de l'homéostasie calcique, à 12 sur la fonction et le remodelage cardiaque.

A ce jour, il n'existe aucune méthode alternative à l'expérimentation animale nous permettant de comprendre l'effet de l'hypoxie intermittente sur les organes et l'organisme entier. L'utilisation d'un modèle de rat est encouragée par nos travaux précédents dans lesquels nous avons effectué une cinétique, 1 à 12 semaines, du développement de la cardiopathie ischémique et mis en évidence une activité sympathique soutenue tout au long de l'exposition à l'HI, associée à une dysfonction cardiaque majorée par rapport aux animaux exposés à la normoxie.

Selon la règle des 3R, nous réduirons le nombre d'animaux utilisé au minimum requis aux vues des besoins de l'étude et pour remplir les conditions nécessaires à la réalisation de tests statistiques. Le raffinement consistera à prendre toutes les mesures possibles et nécessaires afin de limiter la souffrance animale (analgésie, antalgie). Les animaux sont surveillés quotidiennement. En cas d'apparition de signes de souffrance (prostration ou immobilité prolongée, isolement, apathie, râles) ou blessure, saignement, irritation importante, agressivité non naturelle envers ses congénères au cours du protocole les animaux seront retirés et euthanasiés.

10180 Une fonte musculaire importante intervient au cours de nombreuses conditions physiologiques (vieillesse, sédentarité...) ou pathologiques (cancers, dystrophies musculaires, traumatismes, infections, maladies chroniques). En effet, le muscle squelettique représente environ 40% de la masse protéique corporelle et constitue le principal réservoir d'acides aminés mobilisables au cours de ces conditions cataboliques et lors d'apports nutritionnels insuffisants. Les acides aminés libérés sont utilisés à des fins énergétiques, pour la mise en place de la réponse inflammatoire, de la réponse immunitaire ainsi que pour la synthèse des protéines des organes vitaux (cœur, cerveau, poumon). A court terme, l'atrophie musculaire est donc une adaptation métabolique clef qui présente de nombreux avantages. Toutefois, si la situation perdure, l'atrophie musculaire conduit à une diminution de la force et de la fonction musculaire, et contribue à une diminution de la capacité de l'organisme à se défendre contre les agressions. Par ailleurs, la diminution de la force musculaire accroît la sédentarité et entraîne donc une aggravation de la fonte musculaire. Ceci aboutit à l'augmentation des périodes d'hospitalisation et des périodes de récupération ainsi qu'à une mortalité accrue. Prévenir ou réduire les pertes de protéines myofibrillaires au cours d'états cataboliques est donc devenu un enjeu majeur pour limiter l'atrophie musculaire.

L'atrophie musculaire est engendrée par un déséquilibre entre synthèse et dégradation (protéolyse) des protéines, mais c'est principalement le système protéolytique ubiquitine protéasome-dépendant (UPS) qui est à l'origine de la perte de muscle squelettique. Différents travaux ont montré qu'une enzyme spécifique du muscle, MuRF1 (Muscle RING Finger-1) est à l'origine de la dégradation des protéines musculaires au cours d'un état catabolique. De façon intéressante, l'inactivation (KO) du gène MuRF1 protège partiellement de l'atrophie les muscles squelettiques chez l'animal soumis à différentes conditions cataboliques. Ainsi, lors de situations cataboliques, il est maintenant envisageable d'inhiber de façon pharmacologique la fonte musculaire en ciblant MuRF1. Cependant, les protéines préservées dans le muscle grâce à l'inhibition de MuRF1 ne pourront plus fournir d'acides aminés aux organes qui en bénéficient normalement au cours d'une agression (foie, intestin, etc.). L'inhibition de MuRF1 pourrait donc s'avérer délétère à plus ou moins long terme, et une supplémentation en acides aminés pourrait être nécessaire pour maintenir les fonctions vitales. Cet aspect est actuellement inconnu.

Le projet soumis a pour objectif principal de pallier au manque d'approvisionnement en acides aminés en combinant 2 approches : (1) induire une situation catabolique chez des souris dont l'E3 ligase muscle-spécifique MuRF1 est inactive et (2) apporter des acides aminés exogènes pour maintenir l'homéostasie protéique au niveau corps entier. Dans notre projet, nous utiliserons des souris invalidées pour MuRF1 qui mimeront l'utilisation de drogues. L'état catabolique sera déclenché par la diffusion de dexaméthasone (Dex) à partir d'un implant. La Dex est un glucocorticoïde de synthèse, inducteur de l'atrophie musculaire. L'objectif principal de ce travail sera

de déterminer si l'approvisionnement en acides aminés exogènes peut suppléer le rôle du muscle squelettique et couvrir le besoin des autres organes en conditions cataboliques, alors que l'activité de MuRF1 est inhibée afin de préserver la masse musculaire.

Un total de 80 souris mâles sera utilisé dans cette expérimentation, 40 souris c57black6 standard (contrôles, CT) et 40 souris c57black6 invalidées pour le gène MuRF1 (MuRF1^{-/-}). Les animaux seront placés en adaptation à un hébergement en cage individuelle pendant 3 semaines et seront répartis en lots de 10 animaux (8 lots au total). Après la période d'adaptation les animaux seront traités ou non à la dexaméthasone (Dex, eau de boisson) pendant 14 jours. La dexaméthasone est un glucocorticoïde de synthèse qui entraîne une perte de muscle squelettique. Les souris traitées à la Dex augmentent leur appétit et il faudra donc effectuer un pair-feeding par rapport aux animaux contrôles. Les animaux seront soit nourris avec un régime standard, soit avec un régime supplémenté en acides aminés (aa+). Les groupes suivants seront donc utilisés :

- 10 souris CT
- 10 souris CT aa+
- 10 souris CT Dex
- 10 souris CT Dex aa+
- 10 souris MuRF1^{-/-}
- 10 souris MuRF1^{-/-} aa+
- 10 souris MuRF1^{-/-} Dex
- 10 souris MuRF1^{-/-} Dex_aa+

Les souris seront suivies au niveau de leur poids, de leur prise alimentaire, et de leur comportement. Il s'agit de méthodes non invasives. Un certain nombre de critères physiologiques et comportementaux sont définis afin de s'assurer de l'absence de souffrance des animaux pendant le protocole. Le projet sera réalisé selon la règle des 3Rs en accord avec la réglementation européenne 2010/63/UE. En effet, différentes expérimentations sur cellules en culture ont permis de cerner les conditions à utiliser pour les animaux (Dex et acides aminés), ce qui permet d'éviter plusieurs pré-expérimentations. De plus, une autre étude effectuée récemment sur souris dans notre laboratoire a permis d'identifier la dose exacte de Dex ainsi qu'une condition d'administration douce (eau de boisson). De plus, le nombre d'animaux est limité au strict minimum pour détecter des variations significatives (voir paragraphe 3.3.5).

10181 Les cellules du système immunitaire qui circulent dans le sang se différencient toutes à partir de cellules souches dites hématopoïétiques dans la moelle osseuse. Lors de ce processus de différenciation, les cellules se spécialisent progressivement dans la production d'un type cellulaire en formant des progéniteurs de plus en plus spécialisés. Les facteurs qui peuvent influencer la différenciation des cellules souches et des progéniteurs restent mal connus. Un de ces facteurs est la localisation dans la moelle osseuse des cellules souches et des progéniteurs. Par exemple la proximité des cellules souches avec d'autres types cellulaires (cellules mésenchymateuses, ostéoclastes, etc...) a été montrée comme nécessaire à la différenciation cellulaire.

Comprendre l'influence de la localisation dans la moelle osseuse sur le devenir des cellules souches et des progéniteurs est l'objectif de ce projet. Une meilleure compréhension de ces aspects est nécessaire pour améliorer les protocoles de greffe de moelle osseuse ou le développement de meilleurs traitements alternatifs pour les maladies hématologiques ou immunitaires. Ainsi récemment des transplantations de cellules souches avec des cellules de soutien ont permis d'améliorer la prise de la greffe.

Pour ce projet, 672 souris seront utilisées, qui possèdent un marqueur inductible localement dans les cellules hématopoïétiques, visible sous le microscope. Cela permettra de suivre le devenir des cellules en fonction de leur localisation. Les souris utilisées dans ce projet subiront des dommages faibles ou modérés

Aucune technique de remplacement n'est disponible à ce jour. Alors que les vertébrés simples ont un système immunitaire et sanguin très différent de l'homme, la souris a extensivement été utilisée pour prédire le comportement de cellules humaines immunitaires et sanguines, et les résultats expérimentaux dans la souris ont montré d'importantes implications pour les thérapies humaines.

De plus à l'heure actuelle, il n'est pas possible de modéliser l'environnement complexe qu'est la moelle osseuse in vitro et donc une étude chez la souris est un outil indispensable pour ce projet. Ce projet contribuera à une meilleure compréhension des facteurs provenant de la moelle osseuse nécessaire pour la différenciation des cellules immunitaires et par ce fait contribuera également à améliorer la culture de ces cellules, ce qui sera utile pour le développement de thérapies mais aussi de procédures de remplacement.

Dans tous les cas où le nombre de souris peut être réduit le principe de réduction est appliqué. Ainsi les tests seront effectués graduellement et arrêtés lors d'un résultat satisfaisant. En accord avec les recommandations internationales dans le domaine de l'hématologie, les animaux seront suivis quotidiennement afin d'assurer leur bien-être et les expérimentations seront arrêtées avant la souffrance des animaux.

10182 L'obésité et le diabète de type 2 se développent à la vitesse d'une épidémie en France. Des études récentes montrent que, selon les organes considérés, ces pathologies induisent un stress oxydant et une insulino-résistance. Récemment, une méta-analyse a indiqué que les acides gras polyinsaturés (AGPI) oméga 3 étaient délétères dans le diabète de type 2 malgré des propriétés insulino-sensibilisatrices. Or, ces AGPI sont très sensibles au stress oxydant : leur effet délétère dans le diabète de type 2 pourrait s'expliquer par des attaques radicalaires qui favoriseraient la production de composés toxiques à partir de la dégradation des AGPI oméga 3. Le thé vert (TV) présente des propriétés antioxydantes et pourrait protéger les (AGPI) n-3 et leurs vertus insulino-sensibilisatrices. Dans cette étude, le diabète de type 2 sera induit en nourrissant les rats avec un régime riche en graisse et en les traitant ultérieurement à la streptozotocine (STZ, diluée dans du tampon citrate pH 4,5) pour augmenter la glycémie. Les animaux seront traités ou non avec des AGPI oméga 3 et/ou un extrait de thé vert. Le travail sera scindé en 2 parties : i) lors d'une étude préliminaire (3 groupes de 4 rats, soit 12 rats au total), nous vérifierons l'effet délétère des AGPI oméga 3 (EPA, en l'occurrence) et nous nous assurerons que l'effet toxique éventuel n'est pas dû à la seule administration du tampon citrate, pH 4,5. L'expérience touchera un groupe de rats nourris avec un régime riche en graisses traités à la STZ (sans EPA), un groupe de rats nourris avec un régime riche en graisses + EPA traités à la STZ plus un groupe nourri avec un régime riche en graisses + EPA injecté avec le tampon citrate uniquement (sans STZ). Afin de respecter un bien-être animal maximum, la période post-injection sera limitée à 2 jours. Cette durée permettra de déceler les anomalies précoces chez l'ensemble des animaux, ce qui permettra d'orienter les futures recherches et d'éviter la multiplication des études ultérieures et l'euthanasie de nombreux animaux. Nous profiterons de ce travail pour savoir quel(s) organe(s) est(sont) le(s) plus touché(s) en mesurant la fonction cardiaque in vivo à l'aide d'une sonde Millar introduite dans le ventricule gauche via la carotide droite; en déterminant in vivo la saturation du sang en oxygène; en estimant la glycémie et l'insulinémie; en mesurant les lipopolysaccharides circulants; en mesurant les corps cétoniques dans le sang; en évaluant les enzymes hépatiques sanguins; en estimant la variation du poids des muscles squelettiques; et en déterminant les ARN messagers pour les cytokines inflammatoires et différents paramètres du stress oxydant dans le sang et dans les différents organes (cœur, poumon, foie, rein, pancréas, muscles squelettiques). Si et seulement si la détérioration des animaux diabétiques de type 2 ingérant l'EPA n'est pas due à la seule injection du tampon citrate pH 4,5, la deuxième partie de l'étude sera entreprise. Elle inclura 5 groupes de 10 animaux (soit 50 rats) : un groupe de rats témoins nourris avec un régime équilibré sans injection de STZ (sans EPA et sans TV), un groupe de rats nourris avec un régime riche en graisses avec injection de STZ (sans EPA et sans TV), un groupe de rats nourris avec un régime riche en graisses avec injection de STZ traités à l'EPA (sans TV), un groupe de rats nourris avec un régime riche en graisses avec injection de STZ traités au TV (sans EPA), et un groupe de rats nourris avec un régime riche en graisses avec injection de STZ traités à l'EPA et au TV. La durée post-injection sera limitée à 2 jours pour réduire la souffrance animale. En fonction des résultats de l'étude préliminaire mentionnée ci-dessus, certains aspects du fonctionnement des organes seront évalués (fonction de perméabilité de la barrière intestinale, fonction cardiaque, pulmonaire, hépatique, rénale, pancréatique ou musculo-squelettique). L'ensemble des expériences utilisera un minimum de 12 animaux et un maximum de 62 rats si l'étude préliminaire indique que l'aspect délétère de l'EPA

n'est pas due à la seule injection du tampon citrate (Réduction de la règle des 3 R). La souffrance animale devrait être réduite à son minimum compte-tenu de la courte période post-injection choisie, de plus l'animalier observera quotidiennement le comportement général et l'apparence des animaux (Raffinement de la règle des 3 R). Il nous sera cependant impossible de remplacer le modèle animal par un autre modèle biologique (Remplacement de la règle des 3R), car le comportement des animaux après l'injection de streptozotocine dépend de multiples interactions entre différents organes qui ne peuvent pas être modalisées à l'aide de cultures cellulaires.

10183 Il est maintenant bien admis que le cerveau conserve tout au long de la vie, la capacité de se régénérer en produisant de nouvelles cellules et en particulier de nouveaux neurones, et ce, même à l'âge adulte. Plusieurs régions du cerveau ont été identifiées comme capables de se régénérer, en particulier l'hypothalamus. L'hypothalamus est une zone localisée à la base du cerveau, de part et d'autre du troisième ventricule qui contrôle les principales fonctions biologiques dont la reproduction. Toutefois, nous ne connaissons pas les facteurs capables de déclencher cette activité de régénération neuronale aussi appelée neurogenèse. La connaissance de ces facteurs pourrait nous donner des pistes intéressantes pour trouver des substances capables de stimuler la production de nouveaux neurones dans le cerveau adulte.

Ces processus de régénération ou neurogenèse pourraient participer à la régulation cyclique de l'activité de reproduction chez les animaux saisonnés, comme l'ovin. En effet, pour survivre aux variations annuelles de l'environnement liées à l'alternance des saisons, les organismes vivants aux latitudes tempérées ne se reproduisent pas toute l'année. Ainsi la période de reproduction des ovins est limitée à l'automne et l'hiver, ce qui conduit après une gestation de 5 mois, à la naissance des petits au printemps, la période de l'année la plus favorable à leur survie.

L'objectif de ce projet est d'identifier les facteurs inducteurs de neurogenèse présents dans le liquide céphalorachidien (LCR) qui agissent directement dans l'hypothalamus en contact avec le LCR. Cette étude sera réalisée grâce à une approche d'analyse par spectrométrie de masse.

Remplacer : Cette étude ne peut être réalisée qu'in vivo, car les analyses ne peuvent pas être faites ou reproduites in vitro et encore moins in silico, mais l'approche longitudinale (chaque animal sera son propre témoin) permet de réduire le nombre d'animaux expérimentaux.

Réduire : Le groupe d'animaux expérimentaux comportera vingt brebis parce que nous ne pouvons pas écarter la perte de quelques animaux au cours de l'expérience qui s'étale sur 12 mois.

Raffiner : Des mesures de réduction de la douleur seront mis en place pendant les procédures expérimentales (injection d'antalgiques, contrôle de l'anesthésie, administration d'anti-inflammatoires). Les brebis seront sous observation régulière (surveillance de la température corporelle et de la prise alimentaire, observations comportementales) et nous mettrons en œuvre des procédures veillant à réduire le stress (brebis maintenues ensemble au sein d'un environnement social stable, conditions adaptées aux herbivores avec litière de paille et foin ad libitum) et l'inconfort des brebis (administration prolongée d'anti-inflammatoire, traitement quotidien d'antibiotiques pendant 5 jours en cas d'infection).

10184 Au cours du siècle dernier, les régimes alimentaires ont drastiquement évolué, entraînant notamment une carence en acides gras polyinsaturés (AGPI) n-3, également connus sous le nom d'oméga-3, au profit des oméga-6. Or, les oméga-3 sont nécessaires pour le bon fonctionnement cérébral et la santé mentale. Ainsi, des études cliniques et précliniques suggèrent qu'une carence en oméga-3 constitue un facteur de risque important pour le développement de troubles neuropsychiatriques comme les troubles de l'humeur. Par exemple, les patients dépressifs présentent des taux d'oméga-3 dans le sang et le cerveau qui sont plus faibles que dans le reste de la population. Notre projet s'inscrit dans ce contexte puisqu'il vise à mieux comprendre les mécanismes neurobiologiques par lesquels les oméga-3 jouent un rôle dans le fonctionnement cérébral, notamment dans les aires responsables de l'activité motrice, de la cognition, de l'anxiété ainsi que la prise de décision.

De plus, la recherche internationale a montré que des régimes alimentaires dont la quantité de lipides a été altérée peuvent directement influencer la composition lipidique de l'organisme. Au laboratoire, le rôle des oméga-3 sur le fonctionnement cérébral et la santé mentale est étudié depuis

presque 10 ans. Le laboratoire a récemment ouvert une nouvelle hypothèse, en démontrant que les apports en oméga-3 avaient un impact direct sur la transmission synaptique ainsi que l'architecture des neurones. La plasticité synaptique regroupe les phénomènes qui confèrent au cerveau sa capacité de s'adapter à l'environnement, par des modifications de la connectivité entre les neurones, au niveau des synapses. Les différentes formes de plasticités synaptiques sont indispensables aux mécanismes d'apprentissage et d'évolution. Les oméga-3 sont des modulateurs importants des fonctions synaptiques, car, faisant partie des éléments structuraux des membranes plasmiques, ils modulent la dynamique membranaire ainsi que la fonctionnalité et la circulation (la fluidité également) des protéines présentes à la synapse.

Dans ce projet, nous faisons l'hypothèse qu'un régime supplémenté en oméga-3 pourrait apporter une meilleure plasticité des fonctions synaptiques. Afin de tester notre hypothèse, nous souhaitons tester la plasticité synaptique chez des animaux nourris avec des régimes dits "standards" ou avec des régimes enrichis en oméga-3. Si notre hypothèse s'avère correcte, nous montrerons ainsi l'impact crucial que peut avoir l'alimentation, plus particulièrement la teneur en oméga-3 des aliments, sur le fonctionnement cérébral. Ce projet vise également, sur un axe transversal, à établir les bases de l'axe entre nutrition (intestin) et fonctionnement cérébral.

Pour ce projet d'un an, nous anticipons l'utilisation de 144 souris mâles C57Bl6/j. Nous estimons que 48 souris par groupe expérimental (par régime alimentaire) sera suffisant.

L'ensemble des procédures proposées est en conformité avec les directives européennes 2010/63/UE et françaises, dans le respect des nouveaux standards de soin et de bien-être des animaux (règle des 3Rs), appliqués dans notre équipe de recherche : régulation de la température, de l'hygrométrie, raffinement de l'enrichissement des cages pour améliorer leur hébergement (mise à disposition de maison en carton et de morceaux de coton, favorisant ainsi la construction d'un nid ainsi que le jeu, indispensable à la sociabilisation des animaux). Ce projet ne peut être réalisé sans l'utilisation de modèles animaux puisqu'il s'intéresse à des dimensions de régimes alimentaires ainsi qu'à l'évaluation de la fonction et la transmission cérébrale, non modélisables sur des modèles in vitro ou in silico. Les recherches seront réalisées en accord avec les recommandations institutionnelles pour le bon traitement des animaux de laboratoire. Tous les efforts seront faits pour réduire le nombre et la souffrance des animaux utilisés afin d'éviter les répétitions inutiles. Par ailleurs, afin d'éviter toute souffrance, des points limites (critère d'arrêt) sont mis en place systématiquement.

10185 Malgré les avancées significatives réalisées ces dernières années dans le traitement des cancers, beaucoup de patients ne répondent pas aux traitements disponibles. Des développements de nouvelles stratégies sont nécessaires. La restauration d'une immunité efficace contre les cellules tumorales est une stratégie prometteuse. Notre laboratoire a mis au point et breveté une nouvelle stratégie de vaccination très prometteuse, applicable à un grand nombre de cancers mais aussi aux infections virales et en médecine vétérinaire. Cette technologie est basée sur une plateforme pseudo-virale dans laquelle sont insérés des fragments d'antigènes tumoraux ou viraux, et constitue un outil thérapeutique puissant pour activer le système immunitaire contre les cellules tumorales ou les virus pathogènes. Des analyses in vitro ont permis de montrer l'efficacité de cette stratégie à stimuler des réponses immunitaires effectrices dirigées contre les antigènes présents sur les particules, et des études in vivo avec des particules de grade « recherche » ont permis de démontrer que la vaccination de souris avec un tel complexe induit l'activation de réponses immunitaires dirigées contre les antigènes présents sur la particule, ainsi qu'à l'inhibition complète de la croissance d'une tumeur exprimant les antigènes d'intérêt.

En vue du transfert clinique de cette stratégie, des particules compatibles avec leur utilisation chez l'homme ont été développées. Le but de notre étude est de tester in vivo l'immunogénicité et l'efficacité anti-tumorale de ces nouvelles particules, étape indispensable avant de réaliser des essais cliniques chez l'homme. Pour cela, des souris C57Bl6 seront vaccinées avec les particules portant des fragments d'antigènes d'intérêt, et nous étudierons leur capacité à induire des réponses T et B spécifiques, et leur efficacité à inhiber le développement d'une tumeur exprimant l'antigène d'intérêt en conditions prophylactiques et thérapeutiques. De plus l'effet des particules sur des tumeurs n'exprimant pas l'antigène d'intérêt ainsi que l'impact de particules contrôle est nécessaire

pour s'assurer de la spécificité d'action des particules. Nous aurons ainsi 4 groupes d'animaux. Pour chaque groupe, 10 souris seront nécessaires. La vaccination sera réalisée en conditions prophylactiques et thérapeutiques, ce qui fait un total de 80 animaux.

Tout sera mis en œuvre pour respecter la démarche éthique des 3R :

Remplacement : l'étude de la réponse à la vaccination et son impact sur le développement tumoral ne peut s'effectuer que in vivo; ce processus met en jeu différents types cellulaires qui interagissent de façon complexe, ce qui n'est pas modélisable in vitro; le remplacement du modèle animal pour cette étude n'est pas envisageable.

Réduction : les particules vaccinales ont été optimisées et sélectionnées par des tests in vitro afin de réduire les lots d'animaux nécessaires; nous avons réduit les nombres d'animaux/lot au minimum afin d'obtenir des résultats interprétables sur la base des besoins imposés par les tests statistiques.

Raffinement : l'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et évalué grâce à une grille codifiant le niveau de douleur, ce qui permettra d'intervenir immédiatement dès le moindre signe d'inconfort ou de souffrance. La tumeur sera implantée par voie sous-cutanée dans le flanc, ce qui n'entraîne que très peu d'inconfort.

10186 La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative et multifactorielle qui constitue la forme la plus commune de démence sénile. Elle se caractérise par des désordres cognitifs, et en particulier mnésiques, qui affectent gravement la qualité de vie du patient et celle de son entourage et conduisent souvent à un placement du malade en établissement spécialisé. La maladie toucherait aujourd'hui environ 35 millions de personnes dans le monde, dont 10 millions en Europe. Des chiffres qui sont en constante augmentation, en raison notamment du vieillissement de la population. Dans ce contexte, ce projet vise à mettre au point des principes actifs des Multi-Target Directed Ligands (MTDL) ou molécules pléiotropes, associant chacune plusieurs activités dirigées vers plusieurs cibles d'intérêt thérapeutique dans la maladie d'Alzheimer. Parmi ces activités, l'inhibition simultanée des sites catalytique (CAS) et anionique périphérique (PAS) de l'acétylcholinestérase (AChE), ainsi que l'activation des récepteurs de type 4 de la sérotonine (5-HT4R). Ce récepteur est une cible particulièrement prometteuse en termes d'efficacité clinique, car de nature à permettre à la fois un effet thérapeutique symptomatique et curatif vis-à-vis de la maladie d'Alzheimer.

Durant cette étude, nous utiliserons un modèle in vivo indispensable, la souris, afin de tester 6 nouvelles molécules dans 2 tests comportementaux de mémoire (reconnaissance d'objet et l'alternance spontanée). Les rongeurs sont les espèces animales les plus étudiées dans le domaine de la recherche biomédicale. Sur la base des connaissances et des acquis du laboratoire, et des analyses statistiques préliminaires, le nombre de souris par groupe a été fixé à 15 maximum, ce qui permet de donner une puissance statistique suffisante aux résultats obtenus. Les animaux seront répartis dans 19 groupes pour le test de reconnaissance d'objet et 20 groupes pour l'alternance spontanée. Ainsi 585 souris seront requis pour la réalisation de cette étude puisqu'aucun modèle alternatif ne permet d'obtenir les informations nécessaires à ce projet.

Suivant les résultats obtenus aux tests comportementaux, les 2 molécules les plus performantes seront sélectionnées pour réaliser des tests de pharmacocinétique. Pour cela, un effet dose sera recherché pour chacune des 2 molécules (3 doses testées) dans 3 modes d'administrations (intrapéritonéale, intraveineux et per-os) chez deux espèces animales (souris et rat). Les dosages seront réalisés à 6 temps différents. Afin d'obtenir des résultats déterminants, le nombre d'animaux par groupe a été fixé à 3. Cette expérimentation de cinétique animale détaillée est nécessaire et indispensable pour pouvoir extrapoler la pharmacocinétique clinique (chez l'homme).

Tout au long de ce projet, les animaux seront hébergés dans des cages standards aux normes européennes. Les principes éthiques et les standards de raffinement sont utilisés de la naissance à la mort de l'animal. Le bien-être des animaux sera suivi bi-quotidiennement par du personnel formé 5j/7 et quotidiennement pendant les week-ends et jours fériés. Ainsi, notre demande de projet prend en compte le bien-être animal, les pratiques éthiques et répond à la règle des 3R.

Au total, le projet utilisera 1233 animaux.

10187 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, en raison notamment du fait que la formation des plaquettes *in vitro* est différente de ce qui se passe *in vivo*. Il y a donc encore une nécessité d'effectuer 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 des souris contrôles et présentant un défaut du cytosquelette (nous disposons de 3 lignées). Nous observerons également l'impact de substances modifiant le cytosquelette, sur les plaquettes en cours de formation, ainsi que l'impact d'une modification du flux sanguin par rapport aux souris témoins.

Remplacer : les mécanismes de production *in vivo* sont très différents de ce qu'on observe *in vitro*. Etudier ces mécanismes directement dans l'organisme reste indispensable pour élargir nos connaissances afin de pouvoir améliorer la production de plaquettes *in vitro* dans le futur.

Raffiner : Les conditions du travail seront raffinées afin de limiter l'anxiété, l'inconfort, le stress et la douleur associés aux manipulations des souris avant l'anesthésie. Durant l'expérimentation, les souris sont maintenues sous anesthésie générale et analgésie et seront euthanasiées avant leur réveil afin d'éviter toute souffrance. Dans tous les cas, les cages sont enrichies en jouets et coton à déchiqueter pour qu'elles y fassent leur nid, et sont manipulées avec calme et par des manipulateurs avertis pour limiter le stress de contention dans l'intérêt du bien-être animal.

Réduire : 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. Au total, en incluant tous les génotypes et traitements, ainsi que les expériences préliminaires pour le choix de la dose de traitement, nous prévoyons un maximum de 1332 souris.

10188 Le but de ce projet est d'analyser l'implication des canaux VRAC (voltage-regulated anion channels) dans la détection et la régulation des changements d'osmolarité. Cette osmorégulation est vitale pour l'organisme, afin de réguler les fonctions rénales, la soif et l'appétence pour le salé, dans le but de stabiliser l'homéostasie osmotique des liquides extracellulaires.

Les neurones magnocellulaires de l'hypothalamus répondent à des contraintes osmotiques par des changements d'activité électrique corrélée avec la sécrétion de vasopressine dans le sang. Cette vasopressine joue alors un rôle clef dans la régulation de l'homéostasie osmotique, entre autres en induisant une augmentation de l'absorption d'eau par le rein. En outre, certains résultats indiquent qu'une contrainte hypotonique pourrait induire l'activation des canaux VRAC, ce qui aura pour finalité d'entraîner une diminution de sécrétion de vasopressine. Cette hypothèse, basée sur des évidences corrélatives, nécessite d'être validée par une preuve de causalité directe.

Aussi, nous proposons d'inhiber, sur le modèle souris, la fonction de VRAC par une approche génétique afin de tester *ex vivo* son implication dans la régulation osmotique.

Adéquation avec la règle des 3R.

Remplacer : Notre étude porte sur l'analyse de l'interaction complexe et encore mal connue entre différents types cellulaires afin de réguler l'osmolarité. Il n'est donc pas possible, à ce jour, de remplacer l'usage d'animaux vivants, bien que de très nombreuses études préliminaires aient été menées in vitro.

Réduire : Compte tenu des difficultés d'ordre technique attendues, le nombre d'animaux a été réduit au strict nécessaire.

Raffiner : Les animaux seront hébergés de manière collective avec eau et nourriture ad libitum. Les cages sont enrichies avec du matériel de nidation (frisures) et des bâtons à ronger. Les animaux seront placés en cycle jour/nuit 12h/12h en condition de température et d'hygrométrie contrôlée. Il n'est attendu aucun stress ni aucune douleur prolongée chez les animaux requis par cette étude. Toute procédure invasive sera réalisée sous anesthésie générale et analgésie (injection anesthésique local et anti-inflammatoire) et la température de l'animal sera maintenue grâce à un tapis chauffant thermostaté. Le traitement analgésique sera poursuivi en post-opératoire pendant le temps nécessaire et les animaux seront suivis quotidiennement et leur état général évalué.

Nombre total d'animaux utilisés dans ce projet : 60 souris

10189 Lors de la réalisation d'un mouvement - saisir un objet, attraper une balle en vol, écrire un texte, le système nerveux central intègre continuellement une multitude d'informations de différentes sources : des informations visuelles, des informations en provenance du corps, des informations contextuelles ou bien encore des informations mémorisées sur des mouvements exécutés antérieurement. Ce projet explore chez 3 singes macaque rhésus, les bases cérébrales des processus fonctionnels qui partant du traitement des informations sensorielles complexes permettent la réalisation de mouvements dirigés vers un but. Ces processus impliquent l'activation coordonnée d'un ensemble de structures corticales et sous-corticales. Le projet se focalise sur l'organisation du traitement neuronal de l'information au sein des réseaux visuo-moteurs corticaux en lien avec le comportement du singe en action. A ce jour, de nombreux travaux de recherche ont étudié les systèmes visuel et moteur de manière indépendante. Dans ce projet nous allons nous appuyer sur des développements technologiques récents pour analyser en parallèle l'activité neuronale de structures corticales visuelles et motrices ainsi que de structures associatives à l'interface entre processus moteurs et visuels au cours de la réalisation d'une tâche visuo-motrice complexe. Parallèlement, le projet visera également à évaluer l'effet d'agents anesthésiants sur l'activité de ces réseaux corticaux et sur le comportement afin de mieux comprendre les phénomènes de perte de conscience observés dans le cadre d'anesthésies générales. Le projet implique l'utilisation d'animaux car à ce jour, il n'existe pas d'alternatives expérimentales permettant de répondre aux objectifs du projet. Aucune simulation informatique ou culture cellulaire ne peut remplacer le modèle animal vivant pour l'étude des substrats neuronaux de comportements visuo-moteurs complexes.

A l'aide de récompenses hydriques ou alimentaires, chaque singe sera entraîné à réaliser des mouvements du bras dans le plan horizontal pour atteindre des cibles visuelles présentées séquentiellement. Cette tâche sera réalisée sur une plateforme permettant de contrôler la localisation des stimulations visuelles ainsi que de mesurer les mouvements du bras et les mouvements oculaires. Cette plateforme offre également la possibilité de manipuler l'environnement de la tâche (i) pour induire un décalage spatial ou temporel entre la trajectoire du bras et la perception visuelle de cette trajectoire (ii) pour produire une perturbation mécanique de la trajectoire du bras (iii) pour manipuler la séquence d'apparition des cibles visuelles (iv) pour faire inhaler un agent anesthésique gazeux à l'animal. L'ensemble de ces manipulations est essentiel pour comprendre les processus visuo-moteur permettant à l'animal d'apprendre et de s'adapter à différentes contraintes environnementales. Une fois que l'animal sera entraîné dans différentes versions de la tâche, nous implanterons de manière permanente dans le cortex des matrices multi-électrodes dans cinq structures clés le long des voies d'intégration visuo-motrices. Ces matrices permettent d'enregistrer l'activité unitaire d'un ou de plusieurs neurones et les potentiels d'activation locaux (LFP, local field potentials) pendant l'exécution du mouvement. Les analyses se focaliseront sur les modulations de la connectivité fonctionnelle entre les différentes structures enregistrées, en lien avec le comportement des animaux dans la tâche.

Dans ce projet et en accord avec des objectifs de raffinement, l'enregistrement des mouvements oculaires est réalisé en entraînant les animaux à placer la tête dans un masque pour effectuer la tâche expérimentale. Cette approche supprime la nécessité d'une chirurgie invasive pour la pose d'un plot de fixation de tête. Par ailleurs, la réalisation d'enregistrements parallèles dans plusieurs structures corticales contribue aux objectifs de réduction en limitant le nombre d'animaux nécessaires à la compréhension des processus visuels et moteurs pour la réalisation de la tâche. De plus, pour compléter les objectifs de réduction, le projet évaluera l'effet de l'anesthésie générale sur l'activité des neurones corticaux. L'anesthésie générale (AG) est un exemple de manipulation réversible de la conscience, qui est pratiquée chaque jour dans les hôpitaux du monde entier. Alors que les mécanismes qui sous-tendent les effets des anesthésiques deviennent plus clairs au niveau cellulaire, les effets des anesthésiques sur l'activité cérébrale à l'échelle des réseaux neuronaux fonctionnels sont encore débattus. L'AG partage de nombreuses voies communes avec le sommeil, notamment en ce qui concerne la perte et la récupération de conscience, mais elle présente également des caractéristiques électrophysiologiques spécifiques qui sont liées aux effets des médicaments. Il existe très peu de données sur le comportement individuel des neurones lorsqu'ils sont soumis aux doses anesthésiques qui font perdre conscience. Certaines théories prédisent que l'anesthésie générale est un phénomène global plus que neuronal et que la perte de la conscience n'est dû qu'à un phénomène de déstructuration du réseau bien plus qu'à la dysfonction des neurones. La possibilité d'enregistrer simultanément l'activité de larges populations de neurones dans différentes structures corticales est une opportunité rare qui permettra de mettre en évidence la réelle action des anesthésiques aux doses de l'anesthésie générale. Pour cette partie du projet, la participation des animaux va consister en 4 séances expérimentales spécifiquement dédiées à cette procédure.

Les deux premières séances consisteront à endormir l'animal par inhalation gazeuse (Sévoflurane) en dehors de toute tâche comportementale. Dès la perte de conscience de l'animal, l'administration du gaz sera cessée jusqu'au retour de la conscience pour étudier les transitions conscience-inconscience-conscience. Les deux autres séances consisteront à perturber les tâches de coordination visuo-motrice par inhalation de doses croissantes d'anesthésiques chez l'animal en comportement. Cette approche permettra de mettre en évidence le phénomène de déstructuration de l'activité neuronale de réseau. Les résultats attendus sont uniques sur les mécanismes de l'anesthésie générale et des états modifiés de conscience.

10190 L'une des fonctions majeures de l'intestin est son rôle de barrière qui vise à limiter l'entrée dans l'organisme de composés potentiellement délétères. Cette fonction de barrière est altérée dans de nombreuses pathologies comme les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, le syndrome de l'intestin irritable ou le cancer colorectal. L'homme contemporain est exposé de manière chronique à de nombreux stress environnementaux (exposition aux contaminants alimentaires, stress psychologiques...) qui peuvent fragiliser la fonction barrière intestinale. L'utilisation croissante de produits contenant des nanoparticules (objets de taille <100 nm) dans l'alimentation représente aujourd'hui un réel enjeu de santé publique. En particulier, l'argent peut être retrouvé sous forme nanoparticulaire et/ou forme ionique (Ag⁺) non seulement dans l'additif alimentaire E174 mais également dans d'autres domaines d'application en lien avec l'alimentation, comme les emballages ou les compléments alimentaires (argent colloïdal). L'argent étant connu pour avoir une activité antimicrobienne, les données sur les interrelations entre ingestion de (nano)-argent (forme ionique et/ou solide) et modulation du microbiote et du mucus, deux acteurs clés de la fonction barrière de l'intestin, sont limitées. De plus, elles ne prennent pas en compte l'incidence croissante des épisodes de stress chroniques auxquels l'homme contemporain est exposé et qui exercent un impact négatif sur la fonction barrière de l'intestin, suggérant une probable exacerbation des effets délétères de ces nanoparticules.

L'EFSA a souligné à travers sa demande de réévaluation toxicologique de l'additif alimentaire E174 auprès de la communauté scientifique, la nécessité d'explorer les effets de l'argent sur l'organisme. De plus, la consommation de l'argent colloïdal en tant que complément alimentaire est croissante. Cette étude a pour objectif de déterminer les conséquences physiologiques d'une exposition orale au E174 et à l'argent colloïdal sur les différents acteurs (épithélium, microbiote et mucus de l'intestin)

de la fonction barrière de l'intestin, en condition de fonction barrière intègre ou fragilisée par exposition à un stress chronique.

De ce fait, seule une approche faisant appel à un modèle animal nous permettra d'explorer la complexité des interactions de l'argent nanoparticulaire ou colloïdal avec les différents acteurs d'une barrière intestinale fragilisée ou non par un stress chronique. L'argent, sous la forme d'additif (E174) ou d'argent colloïdal sera administré par voie orale sur une durée de 28 jours à un animal ayant subi ou non un stress psychologique chronique, un stress passif d'évitement de l'eau, sur les 9 dernier jours de l'étude. 3 concentrations pour chaque forme d'argent, représentatives d'une exposition forte, moyenne ou faible seront testées. L'impact sur la fonction barrière de l'intestin sera exploré en mesurant la perméabilité intestinale, l'intégrité du mucus intestinal et en déterminant la composition du microbiote (flore intestinale). Des tests comportementaux viendront compléter l'étude afin d'explorer de potentielles altérations de l'axe intestin-cerveau. L'analyse de la fonction barrière intestinale nécessite l'euthanasie des animaux à la fin des traitements de 28 jours d'exposition.

Afin de limiter au maximum la nécessité de passer par l'exploration in vivo, des études préliminaires sont réalisées sur des lignées cellulaires de colon afin d'explorer l'effet de l'argent sur l'épithélium intestinal, en présence ou non de mucus, afin de mettre en évidence des effets doses de l'argent sur la cytotoxicité ainsi que la fragilisation de la barrière in vitro.

Durant l'expérimentation, toutes les dispositions afin de minimiser l'inconfort ou la souffrance de l'animal seront prises (prélèvements de sang réalisés sous anesthésie par exemple). Pour obtenir des résultats avec une puissance statistique suffisante, ce projet nécessite 576 souris C57BL/6 élevées dans des conditions optimales d'hébergement (contrôle des températures et du cycle jour/nuit), avec suivi quotidien de leur bien-être et prise en charge en cas d'inconfort.

10191 La technique endovasculaire (passage de matériel à l'intérieur des vaisseaux) a des avantages pour minimiser le risque chirurgical lorsque les organes sont peu accessibles. L'essor récent des procédures mini invasives en neurochirurgie s'est concrétisé ces dernières années par des procédures endovasculaires innovantes comme les embolisations vasculaires ou les thrombectomies mécaniques. Parallèlement, plusieurs organes ont fait l'objet ces dernières années de protocoles d'injection de cellules souches par voie intraveineuse mais la plupart se sont soldées par des échecs en raison de l'importance du filtre pulmonaire où 99% des cellules injectées se retrouvaient éliminées.

L'idée de l'Extroducer, dispositif endovasculaire innovant, est de permettre l'accès à un organe difficile d'accès comme le cerveau. Outre l'applicabilité à la recherche des cellules souches, l'accès cérébral permettrait l'essor d'autres approches innovantes dans le domaine de l'électrophysiologie, des mouvements anormaux ou de la neuro oncologie.

L'objectif de cette étude est de vérifier l'accessibilité des sinus latéraux intracrâniens à la pose d'un implant de type Extroducer, puis d'étudier l'innocuité de la procédure sur un modèle animal. Le dispositif Extroducer est prévu pour être fixé sur un microcathéter et inséré par voie veineuse jusqu'au cerveau. La particularité de l'anatomie veineuse cérébrale fait que les veines cérébrales qui sont en communication directe avec le réseau jugulaire sont appelées sinus et sont par définition limitées par la dure mère au contact (membrane fibreuse, dure et rigide, qui entoure le cerveau). Un accès veineux sinusien permet donc d'être au contact de la dure mère. L'idée du projet est de franchir la dure mère grâce à l'implant qui sera donc inséré par voie endovasculaire veineuse et mis en place en position transdurale. En fin d'étude, une observation macroscopique des tissus cérébraux sera réalisée afin de vérifier l'absence de complication locale.

Le modèle choisi est celui du porc pour son anatomie veineuse proche de celle de l'Homme. Seulement 2 animaux sont prévus dans un premier temps car il s'agit d'une étude préliminaire. Si les résultats sont satisfaisants, alors un projet plus complet pourra être envisagé.

Dans le cadre de ce projet, tout sera mis en œuvre pour respecter au mieux la règle des 3R :

(Remplacer) Il s'agit d'une étude ayant pour objectif de démontrer l'efficacité et la précision d'une technique interventionnelle, qui nécessite de travailler sur un organisme vivant pour évaluer les complications éventuelles.

(Réduire) Il s'agit d'une étude pilote. C'est pourquoi il a été décidé de tester la faisabilité de la procédure sur 2 animaux seulement dans un premier temps.

(Raffiner) Les gestes interventionnels seront toujours réalisés sous anesthésie générale afin de prévenir la souffrance et l'angoisse de l'animal, de même que l'euthanasie. La douleur pendant et après l'intervention sera gérée avec un antalgique de type morphinique. Pendant la phase de surveillance post-opératoire, l'évolution clinique des animaux sera évaluée quotidiennement. Plusieurs critères feront l'objet d'une surveillance accrue pour permettre l'évaluation de leur état général et la prise de décision adéquate (perte d'appétit, apparition d'un déficit moteur, prostration, agressivité excessive).

10192 Chez les patients diabétiques et sclérodermiques, les altérations de la circulation sanguine cutanée provoquent des ulcérations cutanées chroniques diminuant ainsi la qualité de vie et pouvant conduire à une amputation dans les cas graves. L'utilisation en clinique de vasodilatateurs par voie sanguine ou orale permet d'améliorer la cicatrisation mais leur utilisation provoque des effets systémiques comme l'hypotension qui peuvent amener à un arrêt du traitement. Le traitement local des ulcères chroniques permettrait de réduire les effets secondaires liés au traitement et d'augmenter l'efficacité. Les nanoparticules lipidiques représentent une innovation dans la formulation de médicament. Elles sont caractérisées par des nanoparticules de 1 à 100 nm de diamètre et composées de lipides biocompatibles non toxiques. Nous avons observé que les nanoparticules lipidiques permettent de contrôler le relargage du principe actif et d'avoir une action locale par rapport à une forme pharmaceutique classique et nous avons démontré l'action d'une formulation sur un modèle de cicatrisation sur souris diabétiques.

Cette étude permettra de caractériser l'efficacité de ce traitement sur la cicatrisation d'ulcères de souris sclérodermiques ainsi que la cicatrisation d'ulcères ischémiques de souris diabétiques.

Nous avons choisi de travailler sur un modèle de souris car il est impossible de remplacer l'animal pour représenter le phénomène de cicatrisation sur le long terme (Culture cellulaire, peau de synthèse, simulation informatique). Nous avons réduit le nombre d'animaux utilisés par la sélection de la formulation candidate parmi 3 formulations lors d'une étude précédente. Nous utiliserons un total de 128 animaux lors de cette étude. Les animaux seront suivis tous les jours pendant le traitement avec un traitement analgésiant adapté et des points limites adaptés afin de raffiner leur utilisation.

10193 L'accident vasculaire cérébral (AVC) ischémique est une pathologie neurologique survenant après l'occlusion d'une artère irriguant le cerveau. Cette pathologie est la 3ème cause de mortalité et la première cause de handicap acquis chez l'adulte dans le monde. En France, cent trente mille nouveaux cas sont répertoriés par an. L'AVC pose donc un problème majeur tant dans le domaine de la santé publique que sur le plan humain. Actuellement, la prise en charge des patients à la phase aiguë de l'infarctus cérébral est réalisée par l'injection intraveineuse de l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) associée ou non à la thrombectomie. Toutefois, seule une faible proportion des patients (<10%) peut être traitée du fait des effets secondaires de l'injection de tPA et de la relative difficulté d'accès à la thrombectomie. Ainsi, il paraît indispensable de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques innovantes visant à traiter efficacement cette pathologie.

L'objectif de cette étude vise à identifier in vivo la dose minimale efficace et le meilleur candidat d'un composé anti-thrombotique sous sa forme humanisée dans le traitement des infarctus cérébraux. Pour cela, cette stratégie thérapeutique sera étudiée à l'aide d'un modèle d'infarctus cérébral qui reproduit au mieux la physiopathologie de l'AVC permettant une meilleure transposabilité des résultats obtenus vers la clinique. Ainsi, l'AVC sera induit sur des souris Swiss (*Mus musculus*) mâles âgés de 10 à 12 semaines, en utilisant le modèle d'AVC thromboembolique dont le principe repose sur l'injection d'un agent coagulant (la thrombine) directement dans la lumière artérielle. Ce modèle est aujourd'hui très bien caractérisé chez la souris et toutes les procédures seront organisées afin de se conformer à la règle des 3Rs, ainsi toutes les manipulations douloureuses seront réalisées sous anesthésie générale avec couverture analgésique pour éviter toutes douleurs, souffrances et angoisses. De plus, les données de la littérature ainsi qu'une étude de puissance statistique en amont permettent de nous assurer que nous utiliserons le nombre minimal d'animaux

pour pouvoir conclure d'un effet ou non de notre stratégie thérapeutique. Les critères d'évaluation étant, 1/ le suivi de la reperfusion tissulaire au cours de la première heure post AVC à l'aide d'un système d'imagerie Speckle non invasif et 2/ la mesure des lésions cérébrales à 24 heures post AVC à l'aide de l'imagerie par résonance magnétique (IRM).

Le projet fera l'objet de deux phases distinctes. La première, sera une étude de dose efficace dans laquelle seront comparées 4 doses de la molécule à tester par rapport à 3 conditions contrôles, soit 7 groupes expérimentaux. La seconde, sera la sélection du meilleur candidat humanisé de la molécule (6 formes seront testées) en comparaison à 2 conditions contrôles, soit 8 groupes expérimentaux. Suite à l'analyse de puissance statistique un nombre de 173 animaux au total, répartis sur les 15 groupes expérimentaux, seront nécessaires pour l'ensemble du projet.

Cette étude, ayant recours à l'expérimentation animale, prend en compte le bien-être animal et les pratiques éthiques, et répond à la règle des 3 Rs. Ce projet correspond à l'étape de validation in vivo qui fait suite aux nombreuses validations réalisées in vitro, et ne nous permet pas d'utiliser d'autres moyens que de tester cette stratégie thérapeutique chez l'animal. L'ensemble des connaissances et des acquis dont nous disposons dans la littérature font que la souris est un modèle préférentiel pour mener à bien ce projet. En effet, la souris est une des espèces animales la plus étudiée dans le domaine de l'AVC ce qui permettra une analyse comparative et critique des résultats obtenus. Les expériences seront réalisées par du personnel qualifié en respectant les règles de bonnes pratiques de laboratoire pour le respect des animaux, tout en veillant à ne pas dépasser les points limites fixés au préalable. Le bien-être des animaux sera suivi bi-quotidiennement par du personnel qualifié 5j/7 et quotidiennement pendant les week-ends et jours fériés et cela pendant toute la durée du projet. Les animaux seront hébergés dans des cages standards répondant aux normes européennes actuelles (Directive 2010/63/UE). Pour éviter de stresser les animaux, les cages seront isolées de tout bruit extérieur et l'accès à l'eau et à la nourriture sera ad libitum. Enfin, une importance particulière sera apportée au bien-être des animaux. Tout sera mis en œuvre pour réduire l'angoisse, la souffrance et la douleur de chaque animal, pouvant être occasionnées pendant le projet. Les principes éthiques et les standards de raffinement seront utilisés jusqu'à l'euthanasie de l'animal.

10194 Notre laboratoire étudie depuis de nombreuses années les régulateurs de l'angiogenèse et de l'invasion des tumeurs sur des modèles cellulaires in vitro. L'angiogenèse est le processus de formation de nouveaux vaisseaux sanguins, intervenant dans des étapes du développement tumoral pour assurer la croissance et l'irrigation des tumeurs in vivo. Les cellules tumorales acquièrent aussi des propriétés invasives et quittent la tumeur primaire. Ce processus est problématique d'un point de vue clinique dans le cas du glioblastome, un cancer du système nerveux central, car il est impossible d'avoir accès aux cellules invasives afin de circonscrire la tumeur.

Aussi, après de nombreuses expériences préliminaires in vitro, nous devons valider nos modèles sur un minimum d'animaux in vivo pour tenir compte du contexte physiologique.

Nous avons caractérisé in vitro deux protéines impliquées dans le développement et l'invasion du glioblastome. Nous voulons évaluer le rôle de ces deux protéines d'intérêt dans l'évolution de cette maladie dans l'optique de définir de nouvelles cibles thérapeutiques. Pour cela, nous utiliserons un modèle murin immunodéficient afin d'implanter des cellules tumorales humaines et ainsi reproduire au plus près les conditions de formation de ces tumeurs chez l'homme. Nous utiliserons le minimum nécessaire d'animaux pour être statistiquement significatifs et scientifiquement irréprochables. L'ensemble des expériences impliquera différents lots d'animaux, dont le total sera de 878. Les animaux sont produits à cet effet dans une structure agréée qui tient compte de l'éthique animale et assure l'élevage et le suivi quotidien des animaux dans les meilleures conditions de bien-être conformément à la législation et la règle des 3R. En effet, afin de réduire le nombre d'animaux, nous utiliserons tous les mâles et toutes les femelles issus des croisements. Ensuite, nous ferons des analyses bio-informatiques afin d'éviter d'utiliser un nombre trop important d'animaux. De plus, les animaux recevront une injection d'analgésique pour éviter la douleur post opération. Les souris anesthésiées seront mises sur des tapis chauffant pour maintenir leur température corporelle et ceci jusqu'à leur réveil pour lequel une surveillance sera réalisée avec grande attention et soin. Les

souris ont également dans leur cage des tunnels en polycarbonate afin d'enrichir leur environnement. Les soins sont toujours effectués par les mêmes expérimentateurs animaliers afin de réduire le stress des animaux.

10195

Depuis quelques années, la recherche s'articule autour d'infrastructures de recherche. Elles permettent à la communauté scientifique d'avoir accès à des équipements ou technologies innovantes pour mener à bien leurs travaux. En biologie en particulier, ces infrastructures peuvent être des réseaux de prestataires de services (plateformes) qui se regroupent pour offrir des services les plus exhaustifs et performants possibles. L'infrastructure dans laquelle notre plateforme est intégrée, a été créée en 2012 pour faciliter l'utilisation des modèles poisson-zèbre (vertébré aquatique) et drosophile (invertébré). Elle fournit principalement des services d'édition du génome et de caractérisation de phénotype(s) grâce à de l'imagerie.

Notre plateforme produit des images du modèle poisson-zèbre en trois dimensions à haute définition. Cette imagerie, réalisée sur des prélèvements post-mortem, permet de mieux comprendre l'organisation de certaines structures anatomiques (en particulier le cerveau, les réseaux de neurones, etc.) et des interactions entre certains tissus, organes ou cellules.

La plateforme mène deux types d'activités :

- 1) Des prestations de service
- 2) Des projets de recherche technologique comme par exemple, la création d'un atlas du cerveau du poisson-zèbre à plusieurs stades de développement avec pour objectif une connaissance fine des structures du cerveau au cours du développement post-embryonnaire.

Ces activités impliquent :

- du maintien de lignées d'animaux (groupe d'individus présentant les mêmes caractéristiques génétiques) en aquariums de laboratoire,
- de mesurer les poissons afin de travailler sur des échantillons standards

Pour mener à bien toutes ces activités précitées sur 5 années, nous estimons que ce projet nécessitera 20500 poissons.

Dans ce cadre, la plateforme œuvre au respect de la règle des 3R :

Raffinement : le maintien des animaux en animalerie est réalisé par des experts qui veillent chaque jour à leur bien-être (observation quotidienne des signes éventuels de souffrance)

Remplacement : l'infrastructure promeut l'utilisation du modèle poisson-zèbre, modèle vertébré non mammifère, pour l'obtention de données qui peuvent permettre de sélectionner des pistes d'études à mener avec un modèle mammifère.

Réduction : les méthodes d'imagerie standardisées réalisées à la plateforme permettent d'obtenir des données statistiques robustes avec moins d'animaux. Nous ne produisons que le nombre de poissons strictement nécessaire à la réalisation du projet en tenant compte des risques de pertes à chaque étape.

10196

La neuroplasticité est une propriété du système nerveux central indispensable à la survie de l'espèce. Cette propriété permet au cerveau de s'adapter à tout changement d'environnement et ainsi de moduler et d'adapter le comportement. Les affections neuropsychiatriques semblent être liées à un déficit de cette neuroplasticité, et cette hypothèse a été émise en particulier chez les patients dépressifs. Le déficit de neuroplasticité pourrait être dû à certains dysfonctionnements. En particulier, une altération du squelette de la cellule nerveuse, le cytosquelette neuronal, pourrait être à l'origine de la perte de la plasticité neuronale par modification du système microtubulaire. En effet, des altérations du système microtubulaire ont été mises en évidence dans un modèle animal de dépression, et sont traitées favorablement par des antidépresseurs.

Pour vérifier cette hypothèse, notre projet a comme objectif d'étudier les effets antidépresseurs d'une molécule qui active directement le système microtubulaire. Ce projet ayant pour but d'étudier des phénomènes psychiatriques et des processus pathologiques, les méthodes alternatives actuelles sont insuffisantes. Les modifications cérébrales et comportementales complexes étudiées s'inscrivent dans le cadre d'une étude intégrée et doivent donc être réalisées chez des animaux.

Pour cela nous utiliserons des souris de laboratoire adultes âgées de 8 semaines (360 sur 2 ans). Nous étudierons le comportement des souris dont la plasticité est diminuée soit suite à une modification génétique, soit suite à des stress. Nous les traiterons avec une molécule en développement dont la cible est justement les microtubules afin de voir si les altérations liées soit à la modification génétique soit au stress peuvent être réparées. Les cerveaux de ces mêmes souris seront prélevés afin d'effectuer des analyses neurochimiques et de déterminer si des biomarqueurs de la plasticité sont modifiés par le traitement.

Les analyses comportementales seront effectuées à l'aide de matériels et de logiciels dédiés qui permettent d'automatiser les procédures et d'avoir une meilleure reproductibilité des données et de diminuer le nombre de souris requis. Les analyses neurochimiques seront réalisées chez les souris dont le comportement a été analysé, afin de ne pas augmenter le nombre d'animaux.

Les souris seront observées quotidiennement. Une grille précise d'évaluation des points limites sera utilisée. Tout signe de douleur ou de souffrance chez les animaux sera soulagé avec des analgésiques.

Au terme de ce projet nous espérons déterminer les interactions moléculaires entre microtubules et dépression afin de mieux prendre en charge les patients atteints de troubles thymiques.

10197 Depuis de nombreuses années, les chercheurs et leurs partenaires industriels travaillent au développement de matériaux biologiques pouvant être tolérés par le patient et s'intégrer dans le tissu et même en permettre la fonction. Cela permet la fabrication d'implants ou prothèses. Le tissu osseux est le domaine pour lequel cette technologie et cette expertise sont très demandées. En effet, en clinique la nécessité est grandissante en dentisterie (implants dentaires), d'une part, et en orthopédie (prothèses articulaires, remplacement osseux), d'autre part, du fait d'une amélioration des soins et du vieillissement de la population.

Cependant, fréquemment, en situation clinique comme lors d'études expérimentales, les différents matériaux disponibles et implantés dans l'os se retrouvent encapsulés dans un tissu fibreux qui sépare l'implant de l'os et occasionne son descellement à long terme. Dans cette situation, il n'est pas intégré, on parle de défaut d'ostéointégration. Cette complication a des conséquences cliniques importantes (douleur, dysfonctionnement), entraîne souvent une ré intervention, augmente les coûts et peut engendrer un préjudice physique et psychique sur la patient. Une amélioration de la capacité d'ostéointégration de l'implant est donc nécessaire.

Le greffage de la surface d'un implant par un polymère capable de réagir au contact de l'os (bioactif) favorise l'intégration de l'implant dans l'os et donc sa fixation au long cours. Cela a déjà été démontré avec de nombreux matériaux, dans différents sites et dans différentes indications (ligament artificiel, prothèse de hanche, par exemple).

Le Céramil® est un implant en Alumine poreuse disposant du marquage CE et utilisé depuis 20 ans chez l'homme pour la reconstruction osseuse dans différentes parties du corps humain (pastilles de trépan, cages lombaires, cages cervicales, cales d'ostéotomie tibiale, par exemple). Plus de 6000 poses de ces implants en alumine poreuse ont été réalisées chez l'homme sans aucun cas de rejet ou d'infection connu. Ainsi, la tolérance du biomatériau est bien connue, néanmoins l'ostéointégration présente parfois des échecs. Le greffage de surface pourrait améliorer l'intégration du Céramil® dans le tissu osseux. Une étude in vitro réalisée au sein de l'équipe confirme que le greffage est possible sur l'implant et qu'il induit une différenciation de cellules vers une synthèse osseuse.

L'objectif de notre étude est d'étudier in vivo :

- i) la biocompatibilité (tolérance de l'organisme) de l'implant greffé
- ii) et la capacité du greffage à améliorer (quantité et vitesse) l'intégration à l'os.

L'hypothèse de travail est que le greffage de surface du Céramil® n'induit pas de réaction inflammatoire anormale et permet une intégration au tissu osseux plus rapide et plus importante qu'en l'absence de greffage.

Nous comparerons donc deux groupes : implants greffés et implants nus.

Ces groupes sont comparés à deux temps (4 et 12 semaines) de façon à étudier la cinétique d'ostéointégration.

Les implants (cylindres 6x4 mm) sont positionnés dans les condyles fémoraux de lapins qui reçoivent sur chaque postérieur un implant nu et un implant greffé. Chaque lapin est donc son propre contrôle. La procédure se fait sous anesthésie générale, elle est largement maîtrisée par notre équipe et n'entraîne pas de boiterie chez le lapin. Elle a fait l'objet d'une validation sous une norme ISO. Les animaux reçoivent un antalgique après l'intervention et durant 3 jours. A 4 ou 12 semaines les animaux sont euthanasiés et les condyles sont explantés pour être traités en histologie (coupe) qualitative et quantitative. Nous analyserons la biocompatibilité des implants et l'intégration osseuse.

Vingt-quatre animaux seront utilisés, ce qui est le minimum indispensable pour une interprétation statistique des données et qui tient compte de la faible probabilité de perte d'un animal (morbidity et mortalité associées au modèle faibles) et de la variabilité limitée des réponses. Il n'existe pas de modèles in vitro ou in silico permettant de reproduire la complexité des mécanismes biologiques et biomécaniques impliqués dans l'intégration osseuse. La souffrance sera limitée par analgésie adaptée et contrôlée par l'observation régulière de l'animal. Les animaux ne seront euthanasiés qu'au temps terminal de l'étude, ou avant, en cas de nécessité (surveillance de points critiques préétablis).

10198 Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est le premier cancer primitif du foie en incidence. Il est la 2ème cause de mortalité par cancer dans le monde, et représente 8500 nouveaux cas par an en France. Son traitement repose sur le dépistage des sujets à risque et sur son traitement à un stade précoce afin d'obtenir la guérison. Il survient dans 90% des cas sur un fond de maladie du foie au stade de cirrhose. Malheureusement, le traitement curatif du CHC n'est possible que dans 25% des cas en France, car souvent diagnostiqué trop tardivement. Au-delà du stade curatif, il est accessible à un traitement par thérapie ciblée par sorafénib (Nexavar) qui permet de prolonger de 3 mois la survie des malades traités. Ces dernières années, de nombreux essais thérapeutiques ont testés de nouveaux traitements mais jusqu'alors aucun n'a démontré sa supériorité. Des molécules efficaces restent donc à développer et tester in-vivo.

Afin de progresser dans le traitement du CHC, de nombreuses études ont identifiées les événements génétiques impliqués. Il a ainsi été montré que près de 50% des CHC présentaient une activation aberrante la voie de signalisation intra-cellulaire AKT/mTOR, essentielle dans l'homéostasie hépatocytaire. De plus, il a été démontré que cette voie de signalisation est aussi impliquée dans les mécanismes de fibrose et de cirrhose. Nous proposons ici de tester différentes molécules ciblant la kinase AKT sur un modèle de CHC chez le rat, induit chimiquement par diéthylnitrosamine (DEN), et présentant les différentes phases de fibrose et cirrhose précancéreuses observées chez l'homme.

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

Remplacement : La carcinogenèse hépatique est un processus impliquant différents types cellulaires. Les lignées hépatocytaires tumorales humaines ne permettent pas de reproduire tout ce processus, mais permettront de pré-screener les molécules d'intérêt et ainsi réduire le nombre d'animaux nécessaires. En revanche, le remplacement des modèles animaux dans ces études est actuellement irréalisable. En effet, la pharmacocinétique des molécules à tester ainsi que l'implication dans le CHC d'autres types cellulaires présents dans le parenchyme hépatique sont des phénomènes complexes non-reproductibles actuellement in vivo.

Réduction : Nous envisageons d'étudier 5 molécules différentes, à raison d'une à deux molécules par an, suivant deux approches : préventive et curative du CHC. Ces 5 molécules auront été présélectionnées in vitro à partir d'un pool plus important afin de réduire le nombre d'animaux nécessaires. Dans le même souci de réduction, l'étude curative sera réalisée longitudinalement grâce à de l'imagerie non invasive sur animaux vivants.

Raffinement : L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et évalué grâce à une grille codifiant le niveau de douleur. Cela permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance. Les groupes sociaux d'animaux (âge, fratrie) seront respectés au mieux et un enrichissement approprié du milieu sera utilisé pour diminuer l'angoisse et la contrainte liée aux procédures.

Cette étude nécessitera 540 rats au total.

10199 La présente étude s'attachera à analyser l'impact de la ténascine-C (TNC) sur le développement des carcinomes épidermoïdes squameux de la tête et du cou (HNSCC, head and neck squamous cell carcinomas). La TNC est une molécule de la matrice extracellulaire impliquée dans de nombreux cancers et dont la surexpression est associée à un faible facteur pronostique.

Dans un premier temps, nous allons établir des tumeurs au niveau de la langue de souris sauvage (WT) et déficiente pour la TNC (TNCKO), au moyen d'un carcinogène chimique (4-NQO) placé dans l'eau de boisson. Plusieurs systèmes de régulation spécifique de la TNC seront utilisés dans cette étude, ciblant différents organes (grâce aux modèles murins transgéniques Lox-GFP-hTNC, Sox2Cre, K14-Cre, K14-CreERTM et Coll-Cre) ou ciblant l'animal de façon générale (modèle murin TNCKO). Ceci afin de déterminer quel(s) modèle(s) est (sont) susceptible(s) d'augmenter l'expression de la TNC dans la langue, et donc de pouvoir étudier l'impact de la molécule en sur-expression, sur les tumeurs présentes. Ces tumeurs seront ensuite prélevées après euthanasie des souris, analysées au laboratoire, puis dérivées en lignées cellulaires tumorales.

Dans un second temps, ces cellules cancéreuses obtenues seront greffées chez les souris (WT et TNCKO) par injection dans la langue, pour obtenir un système moins contraignant que l'utilisation d'un composé chimique. Ces cellules seront au préalable, invalidées (shTNC) ou non (shCtrl) pour la TNC. L'apparition et le développement tumoral seront étudiés afin de déterminer le rôle et la contribution de la TNC en provenance des cellules cancéreuses et/ou de l'hôte, dans le mécanisme de tumorigénèse.

Le modèle animal utilisé dans cette étude, permettra de mimer la progression tumorale observée chez l'homme au niveau de la cavité buccale. En effet, le composé chimique 4-NQO produit des tumeurs chez l'animal, comme dans le cas de tumeurs dues à un excès de consommation de tabac et d'alcool chez l'homme. L'objectif est d'étudier grâce à ces modèles de souris génétiquement modifiées, l'impact de la présence (ou non) de la TNC sur le développement de telles tumeurs, afin d'évaluer la possibilité de faire de la TNC une cible thérapeutique.

Réduire :

Le nombre d'animaux nécessaire a été déterminé au minimum mais néanmoins suffisamment pour pouvoir réaliser une analyse statistique pertinente. L'algorithme de Lamorte est utilisé pour déterminer la taille de l'échantillon (outil de calcul de la taille des échantillons biologiques, Université de Boston). De ce fait 540 souris seront utilisées au total pour l'ensemble de cette étude (10 souris par conditions expérimentales).

Raffiner :

Le protocole expérimental prend en compte un potentiel impact sur la souffrance animale et différents critères ont été établis pour justifier un arrêt de l'expérience en cours. Des points limites ont notamment été établis pour éviter toute souffrance animale. Les souris seront également pesées et leur état général évalué 3 fois par semaine. Les données issues de ce suivi individuel seront enregistrées dans un tableau spécifique définissant les points limites expérimentaux (cf. Annexe), et aussitôt analysées. Par conséquent, si un animal atteint à un moment donné de l'expérience, un de ces points limites définis, il sera immédiatement euthanasié. De plus, si une souris présentait des symptômes traduisant l'apparition de douleurs, une injection en IP d'un analgésique sera effectuée une fois par jour jusqu'à disparition des symptômes.

Remplacement :

Le modèle animal est nécessaire car il n'existe pas de modèle pour reproduire in vitro l'ensemble des mécanismes impliqués dans cette étude. Les expérimentations in vivo permettent de mener des études prenant en compte des paramètres impossibles à reproduire sur des modèles in vitro, comme l'environnement tumoral, la réaction du système immunitaire, la dissémination des métastases, les mécanismes physiologiques impliqués, et l'impact sur la survie de l'animal, entre autres exemples. Nous avons choisi le modèle murin car celui-ci est développé depuis de nombreuses années et possède de multiples avantages : nombreuses lignées génétiquement modifiées disponibles, facilité d'accès (utilisation et élevage pratiques, à moindre coût), modèle génétiquement proche de l'homme (plus de 90% d'homologie), etc.

10200 Les produits de santé (médicaments, dispositifs médicaux, etc.) constituent un élément clé dans la dispensation de soins de qualité aux patients. En effet, en alliant innovation et santé, la recherche

et le développement s'avèrent indispensables pour favoriser le progrès médical et l'accès aux meilleurs soins à tous. Or, par nature, les dispositifs médicaux 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. L'innocuité des produits de santé doit donc être testée pour garantir le bon rétablissement des patients après chirurgie. Par ailleurs, tout produit de santé se doit d'être efficace lors de son utilisation clinique.

Il est donc impératif, comme le souligne la réglementation (ex : ISO 10993, Pharmacopées Nationales, lignes directrices (OCDE), directive 2007/47/CE, 21 CFR 820...), de prouver l'efficacité des produits de santé et de réduire au minimum le risque que des réactions indésirables se manifestent avant de proposer un produit sur le marché. Nous sommes fortement engagés dans le développement de méthodes alternatives in vitro : tests de cytotoxicité, test d'irritation in vitro, test de sensibilisation in vitro, modélisation sur cultures tissulaires et analyse mathématique du risque de toxicité. Cependant, les méthodes alternatives existantes à ce jour ne permettent ni de couvrir l'ensemble des risques incombant aux produits de santé ni d'en tester intégralement l'efficacité, en particulier en raison de la complexité des mécanismes de régulation d'un organisme vivant. L'utilisation d'animaux est alors obligatoire pour y parvenir.

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

Dans le cadre des procédures expérimentales, la mise en contact des produits de santé avec le modèle animal ainsi que les soins apportés aux animaux en cours de test nécessitent souvent des actes techniques divers et plus ou moins complexes (gavage, applications topiques, injections, prélèvements, implantations sous-cutanées, intramusculaires...) dont la bonne maîtrise et la bonne réalisation par les équipes techniques sont primordiales pour assurer à la fois le bien-être animal et la pertinence scientifique des résultats obtenus lors de ces procédures. Le maintien d'une bonne maîtrise des actes techniques est assurée par une formation continue de ces équipes qui vient à la suite de leur formation initiale et des formations réglementaires (formation en chirurgie expérimentale en complément d'une formation spécifique en expérimentation animale).

Le nombre d'animaux utilisés dans le cadre cette formation est limité au strict nécessaire. Dès que cela n'impacte pas la santé ni le bien-être de l'animal, l'utilisation d'animaux issus d'une précédente procédure expérimentale de gravité légère ou modérée après une période de repos est privilégiée de sorte à réduire le nombre total d'animaux utilisés. L'estimation maximale du nombre d'animaux utilisés sur les cinq années du projet est de 350 rats, 50 souris, 25 hamsters, 100 cobayes, 200 lapins, 25 ovins, 5 caprins, 10 chiens et 75 porcins.

Chaque animal utilisé dans le cadre de la formation des équipes techniques bénéficie d'une attention et de soins de qualité pendant les actes techniques mais aussi en dehors de ceux-ci afin de lui assurer un bien-être optimal. Lorsque les actes techniques sont susceptibles d'endolorir l'animal, des mesures sont mises en place (par exemple, anesthésie et analgésie des animaux au préalable).

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

10201 Identifier les perturbateurs thyroïdiens potentiels et caractériser leurs effets constitue une priorité de santé publique.

Dans le cadre d'un programme d'investigation sur les perturbateurs thyroïdiens (PT) et les contaminants alimentaires, ce projet a pour objectif général de raffiner les essais conduits sur mammifères lors du criblage des PT. En effet, l'évaluation de potentiels PT fait appel de façon incontournable à des organismes entiers, modèles intégrés reproduisant la complexité des interactions conduisant aux effets toxiques des PT. Cependant, les tests classiques de dépistage des PT sur rongeurs utilisent 1) la mesure d'hormones thyroïdiennes circulantes (HT) qui est peu sensible pour mettre en évidence les PT 2) au niveau histologique, une à deux coupes de thyroïde

seulement, sans quantification, ce qui limite la sensibilité de cette analyse. Or, la caractérisation de la structure histologique de la glande thyroïde est un paramètre très sensible pour évaluer les changements fonctionnels de la fonction thyroïdienne. L'objectif spécifique de ce projet est de mettre en évidence l'intérêt de paramètres histologiques quantitatifs comme marqueurs précoces d'une perturbation thyroïdienne présentant une sensibilité plus importante que de simples mesures d'HT. Seuls des modèles in vivo permettent d'appréhender la complexité de l'action des perturbateurs thyroïdiens sur un organisme et de mettre en évidence le potentiel perturbateur thyroïdien de ces molécules. Comme preuve de ce concept, une hypothyroïdie sera induite chez des souris mâles de 6 semaines, avec une molécule de référence incorporée à l'aliment à différentes concentrations, d'une très faible concentration à une concentration maximale tolérée, sans effet toxique sur 28 jours.

Concernant la Réduction, une étude pilote permettra de réduire le nombre d'animaux de l'étude principale, par une détermination précise du range des doses de molécule de référence à tester dans l'étude principale. Elle permettra aussi de préciser les points limites (Raffinement).

Le nombre de souris dans l'étude pilote sera limitée à 12 (4 animaux par groupe ; 3 groupes : un contrôle et deux doses tests). Le nombre d'animaux par groupe est volontairement limité car il ne s'agira pas de quantifier l'effet des doses sur la fonction thyroïdienne mais seulement de voir s'il est possible de détecter un effet avec l'une et/ou l'autre des doses pour ensuite choisir les doses à administrer aux animaux dans l'étude principale.

Le nombre d'animaux dans l'étude principale sera de 40 souris réparties dans 5 groupes (soit un groupe contrôle et 4 groupes avec 4 doses différentes de la molécule de référence). C'est un nombre maximal d'animaux par groupe qui repose sur notre expérience de ce type d'étude et qui pourra être revu à la baisse en fonction des résultats de l'étude pilote. Le nombre maximal d'animaux utilisés pour le projet sera ainsi de 52.

Raffinement : l'incorporation du PTU dans l'alimentation permet un Raffinement, en évitant ainsi des gavages quotidiens. Les animaux seront hébergés par groupes stables de 4/cage en environnement enrichi (morceaux de papier pour faire des nids). L'analyse sur chaque animal des signes cliniques et de la T4 circulante associée aux analyses terminales biochimiques et histologiques assure aussi le raffinement en optimisant l'utilisation de chaque animal. Les animaux seront observés tous les jours et leur consommation alimentaire mesurée quotidiennement. Les prélèvements sanguins réalisés par du personnel entraîné respectent les bonnes pratiques (en termes de volume et de durée de récupération, surveillance). Le prélèvement sanguin en fin d'étude sera réalisé sur animal anesthésié et précèdera les prélèvements de tissus pour histologie (après euthanasie).

10202 Parmi les types de cancer du foie, le carcinome hépato-cellulaire (CHC) est le plus commun (90% des cas). Différentes stratégies sont recommandées pour traiter ce type spécifique de cancer, elles dépendent essentiellement de l'état de la tumeur (stade, taille, etc.). La chimio-embolisation trans-artérielle (TACE) est une de ces stratégies thérapeutiques. Elle consiste à injecter via un cathéter, un thérapeutique anticancéreux dans les vaisseaux alimentant en sang la tumeur afin de la cibler spécifiquement. Cette intervention peut être couplée à une procédure de résection suivant la taille de la tumeur. Dans chacun des scénarios, l'embolisation est une procédure centrale pour traiter ces cancers extrêmement agressifs. Un point clé à considérer ici est qu'aucune standardisation de ces procédures n'existe, différents protocoles sont mis en place suivant l'établissement clinique mais il est difficile d'évaluer leur efficacité outre que par la survie du patient. C'est pourquoi nous souhaitons proposer dans ce projet de recherche translationnelle, d'une durée de deux ans, de simuler in-silico, à travers un modèle numérique et spécifique du foie du patient, une chimio-embolisation et d'évaluer la meilleure voie d'abord qui permettra de cibler au plus près la ou les tumeurs.

Dans ce contexte, pour générer un modèle numérique réaliste du réseau vasculaire hépatique, il nous faut extraire avec la plus grande précision le réseau vasculaire à partir de l'imagerie médicale du patient. Pour se faire, nous avons besoin d'affiner nos méthodes informatiques sur des modèles expérimentaux pour lesquels nous pouvons contrôler certains paramètres (tailles des vaisseaux, conditions hépatiques, etc.). Nous avons également besoin de disposer d'informations sur le foie à

différentes échelles (macroscopiques et microscopiques), ce qui nous contraint à utiliser des modalités d'imageries expérimentales disponible exclusivement chez le petit animal.

Avantages potentiels du projet :

L'acquisition de différentes images hépatiques chez le petit animal permettra d'affiner et de valider des méthodes informatiques d'extraction du réseau vasculaires hépatiques. Une étape obligatoire pour tirer un meilleur parti des images réalisées en routine clinique.

Effets néfastes attendus sur les animaux :

L'induction de la fibrose et de la cirrhose chez le petit animal est une procédure de classe modérée qui entraîne une diminution de la fonction hépatique mais aucune douleur ou souffrance associée.

Application de la règle des 3R :

Remplacement : Aucun modèle expérimental ex-vivo et/ou in-vitro ne nous permet d'accéder à des conditions vasculaires hépatiques proches des conditions fibrotiques et/ou cirrhotiques. L'emploi d'un modèle expérimental in-vivo est donc indispensable pour avoir accès à la totalité de l'arbre vasculaire dans différentes conditions hépatiques.

Réduction : Le nombre d'animaux prévus est de 60 rongeurs (souris, rats) maximal. Il est réduit le plus possible tout en conservant une puissance statistique significative qui permettra d'interpréter les résultats de cette étude.

Raffinement : Des cages enrichies seront utilisées, des examens d'imagerie non invasifs seront pratiqués. De plus, le modèle utilisé pour induire la fibrose et la cirrhose n'implique pas de souffrance particulièrement notable pour l'animal. Les injections d'agents chimiques se feront par la voie intra-péritonéale par des experts en manipulation des animaux. Les gestes d'injection précis, réalisés par ces personnes réduiront l'angoisse des animaux.

10203 Pour faire face au déclin du stock d'anguilles européennes, un règlement européen pour la reconstitution de l'espèce a été adopté. Parmi ces mesures, des opérations de « repeuplement » font chaque année l'objet d'un appel à projet national d'environ 2 millions d'euros et permettant de déverser environ 3 tonnes de civelles.

L'objectif de notre projet est d'apporter des éléments permettant de réduire le déficit de connaissances en comparant la survie et la croissance des civelles « naturelles » (ayant subi le moins de manipulations possibles) et « repeuplées » (ayant subi le protocole classique : pêche professionnelle, transport, stabulation chez un mareyeur, marquage de masse) à la fois en milieu contrôlé et en milieu naturel. Notre étude consiste à suivre la survie et la croissance d'individus marqués en fonction de leur origine (capturés dans le milieu naturel ou issus du circuit de repeuplement) en milieu naturel et en milieu contrôlé (en mésocosme). Afin d'atteindre cet objectif, il est nécessaire d'utiliser des méthodes de marquage externe des civelles.

La procédure, menée en milieu naturel comme en milieu contrôlé en 2017 et 2018, consistera donc en une étude de croissance et de survie d'individus marqués (microtag, VIE).

En milieu contrôlé, des marques seront implantées sous anesthésie à des civelles afin de distinguer les différents lots. L'évaluation de la croissance (en termes de taille et de poids) et de la survie à court (24h), moyen (3 mois) et long terme (12 mois), sera effectuée par biométrie sous anesthésie. En milieu naturel, les animaux seront capturés puis marqués de la même manière qu'en milieu contrôlé. Une fois marqués, ceux-ci seront relâchés dans le milieu. Des recaptures à moyen terme (3 mois) permettront d'effectuer des dénombrements et des biométries complètes afin d'évaluer la survie et la croissance des anguilles.

Avantages/dommages escomptés. Afin de limiter le stress engendré par la manipulation et de permettre un marquage confortable pour l'anguille et le manipulateur, une anesthésie sera systématiquement réalisée lors des opérations de biométrie et de marquage. La biométrie complète sur les civelles nécessite une euthanasie des individus.

Compte tenu des statuts, vis-à-vis de la législation sur les maladies réglementées des lieux de prélèvement et de l'établissement, les individus utilisés en milieu contrôlé, seront euthanasiés en fin de procédure. Les otolithes seront collectés et utilisés dans le cadre d'une étude sur les relations entre microchimie des otolithes et température.

Nombre d'animaux. Les tests de puissance permettent d'établir le nombre d'animaux nécessaires à ces expérimentations. Compte tenu du taux de recapture escomptée et de la mortalité naturelle

estimée des civelles, environ 6000 individus, soit 2 kg de civelles, par modalités (naturelle et repeuplée) seront nécessaires pour l'expérience en milieu naturel. Pour les expérimentations en mésocosme, 200 individus seront utilisés. De plus, 50 individus seront euthanasiés pour la caractérisation initiale des individus dans chaque modalité. Au total environ 12 500 individus seront donc utilisés.

Conformité avec les trois principes.

Remplacement : les procédures nécessitent l'utilisation d'organismes vivants puisqu'elle vise à évaluer la survie et la croissance d'individus sous différentes modalités.

Réduction : le nombre d'individus a été choisi comme étant le minimum permettant d'obtenir des résultats suffisants (test de puissance). Par ailleurs le nombre de manipulation nécessitant une anesthésie des poissons est réduit au minimum.

Raffinement : lors de chaque manipulation importante (biométrie ou marquage), les anguilles seront systématiquement anesthésiées. En mésocosme, les anguilles seront alimentées et des caches leur seront fournies. Les densités seront limitées à un maximum de 500 civelles/m³.

10204 Les infections relatives à la pose d'implant en chirurgie sont des problèmes cliniques sérieux induisant un taux de mortalité élevé. Les thérapeutiques actuelles (antibiotiques ou molécules naturelles) ne sont plus efficaces et favorisent l'émergence de nombreuses résistances. Ce projet permettra de faire la preuve de concept d'une thérapie prophylactique antimicrobienne innovatrice avec un nouveau système d'implants recouvert d'antibiotiques ou autres substances alternatives aux antibiotiques. Notre objectif est de tester une nouvelle approche d'antibiothérapie délivrée localement par voie intra-osseuse pour combattre ces infections osseuses. Deux études préliminaires ont permis de valider la chirurgie expérimentale de l'ostéotomie partielle du tibia du porc et la pose d'implants cylindriques biomédicaux. Ces études préliminaires ont permis aussi de choisir la souche bactérienne infectieuse et le choix des doses de bactéries pour infectés. Elles ont permis aussi de voir que l'imagerie par IRM et CT-scan (méthodes non-invasives) permettait aussi de suivre l'inflammation due à l'ostéolite et de voir le positionnement des implants dans le temps. Cette expérimentation a pour objectif de mesurer l'efficacité antimicrobienne de ces implants biomédicaux contre l'infection intra-osseuse du tibia chez le porc. L'infection se fera avec une souche *Staphylococcus aureus* (souche sensible aux antibiotiques utilisés en thérapeutique humaine) spécifique de l'os. Des ostéotomies partielles (réalisation chirurgicale d'un trou cylindrique au niveau du tibia permettant la pénétration des bactéries) seront réalisées sur 34 porcs de 3 mois, dont 17 porcs pour une première expérimentation pour tester un antibiotique et une seconde de 17 porcs pour tester une molécule naturelle. Les porcs sont répartis en lots : (i) un lot de porcs ostéomisés, non infectés avec implants traités, (ii) un lot de porcs ostéomisés infectés avec des implants non traités et (iii) un lot de porcs témoins ostéomisés infectés et avec des implants traités. Un suivi par imagerie IRM et CT-scan sera effectué pour visualiser l'inflammation due à l'infection et la tolérance de implants.

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 permettra de déterminer la tolérance de l'os à l'implant traité et de mesurer son efficacité antimicrobienne novatrice. La pose d'implants a été réalisée au hasard selon un plan d'expériences afin de limiter le nombre d'animaux pour chaque expérience tout en répondant aux questions scientifiques. Le nombre d'animaux par lot se base aussi sur les résultats des expérimentations préliminaires réalisées.

Raffinement : L'utilisation de l'imagerie sous anesthésie générale (une seule anesthésie pour le CTscan et l'IRM) permettra de faire le suivi postopératoire de manière non invasive et sans douleur pour l'animal. Les animaux recevront un traitement permettant de contrôler la douleur, sous supervision vétérinaire et zootechnique pendant 15 jours postopératoire.

10205 Les stimulants tels que le méthylphénidate ou les amphétamines sont aujourd'hui donnés aux patients atteints d'hyperactivité ou de narcolepsie. Malheureusement, ces médicaments sont parfois détournés de leur usage dans un but récréatif. En effet, administré par voie intraveineuse ou intranasale (au lieu de la voie orale), le méthylphénidate induit les mêmes effets que la cocaïne. Il

est donc demandé aux fabricants de médicaments (comme c'est déjà le cas pour les opioïdes) d'inclure un système anti-abus pour éviter ce détournement.

Ce projet a pour but d'étudier l'effet de traitements dans un modèle d'hyperactivité induit par un stimulant chez le rongeur. Pour ce projet, nous pensons effectuer 30 études avec pour chaque étude, l'utilisation de 32 rongeurs (4 groupes de 8 animaux par groupe), soit 960 animaux sur 5 ans (voir tableau récapitulatif). Ceci est une estimation et repose sur l'évaluation de 6 molécules par an. Les dispositions prises pour l'application de la règle des 3R seront les suivantes :

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

Pour nos expérimentations, nous avons prévu un nombre d'animaux qui permet de garder une puissance statistique dans le traitement des résultats tout en ayant le nombre de contrôles internes suffisant, afin de pouvoir conclure sur l'efficacité du traitement.

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

Les animaux seront suivis quotidiennement pour pouvoir identifier les signes éventuels de souffrance caractérisés par le comportement (mobilité, alimentation, agressivité, cris...), le poids du corps limité à une perte de 20% maximum par rapport au poids initial, l'état du pelage, la consistance des fèces. Si les signes persistent au bout de 24h, l'animal sera sorti des procédures expérimentales et euthanasié.

- « Remplacer » les modèles animaux :

Notre projet se focalise sur un modèle expérimental d'hyperactivité nécessitant l'utilisation d'un modèle animal. Il n'existe pas de modèle cellulaire reproduisant nos procédures expérimentales.

10206 Les produits de santé (médicaments, dispositifs médicaux, etc.) constituent un élément clé dans la dispensation de soins de qualité aux patients. Or, par nature, ils sont destinés à être mis en contact avec le corps humain. Dès lors, ils représentent une source potentielle de réactions indésirables comme une réaction d'hypersensibilité immédiate (ex : une anaphylaxie, c'est-à-dire une réaction allergique généralisée de l'organisme, sévère et rapide, constituant une urgence vitale pour le patient).

Il est donc impératif, comme le souligne la réglementation (ex : directive 2007/47/CE, 21 CFR 820...) de réduire au minimum le risque que des réactions indésirables se manifestent avant de proposer un produit sur le marché. Notre établissement est fortement engagé dans le développement de méthodes alternatives in vitro : tests de cytotoxicité, test d'irritation in vitro, test de sensibilisation in vitro, modélisation sur cultures tissulaires et analyse mathématique du risque de toxicité. Cependant, les méthodes alternatives existantes à ce jour ne permettent pas de couvrir l'ensemble des risques toxiques incombant aux produits de santé, en particulier en raison de la complexité des mécanismes de régulation d'un organisme vivant. L'utilisation d'animaux est alors obligatoire pour y parvenir.

Des modèles animaux sont donc définis pour chaque type d'essai réglementaire à mener : il s'agit dans ce projet de cobayes. Le nombre d'animaux est défini dans les textes de référence (ex : Pharmacopées nationales...). Le nombre d'animaux utilisés dans le cadre de ce projet est estimé à 150 par an.

Chaque animal bénéficie d'une attention et de soins de qualité pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude. Les animaux sont observés au minimum quotidiennement (observations tracées) et des critères ont été établis pour une identification d'atteinte des points limites. Par ailleurs, les cobayes sont hébergés en groupes sociaux harmonieux et des objets en bois (balles) sont distribués afin de favoriser l'activité d'exploration et de mastication. Enfin, de la musique est diffusée en salle d'hébergement.

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

10207 Le foie est un organe majeur dans la régulation du métabolisme. Il communique étroitement avec d'autres organes pour assurer ses fonctions vitales. Parmi ces organes, le tissu adipeux blanc stocke les graisses et les libère sous forme d'acides gras dans la circulation à des fins énergétiques. Ces acides gras arrivent au foie pour être dégradés. Le tissu adipeux brun, quant à lui, utilise les

acides gras comme substrats pour produire de la chaleur (thermorégulation). Ceux-ci sont ensuite libérés dans la circulation et dirigés vers le foie pour être dégradés.

Dans un contexte d'insulino-résistance et/ou diabète de type II, la libération d'acides gras par le tissu adipeux blanc est augmentée, résultant en une arrivée massive d'acides gras au niveau du foie. Cependant, les conséquences de ces pathologies sur la thermorégulation au niveau du tissu adipeux brun sont encore mal connues. La compréhension des mécanismes de régulation de la thermorégulation par l'insuline représente donc un enjeu important.

Nous étudierons le rôle d'une protéine de la voie de signalisation à l'insuline dans le dialogue inter-organes nécessaire à l'homéostasie énergétique et à la thermorégulation. Pour cela, nous utiliserons des souris génétiquement modifiées qui n'expriment pas cette protéine uniquement dans le foie.

Dans un premier temps, nous traiterons des souris avec une molécule pharmacologique qui induit la libération d'acides gras du tissu adipeux vers la circulation conduisant à l'augmentation des graisses circulantes.

Nous mesurerons les conséquences de cette accumulation de graisses en terme d'expression du génome et de sécrétion d'hormones hépatiques. Le rôle de la protéine d'intérêt au niveau du foie sera évalué grâce à un modèle de souris dont le gène codant pour cette protéine a été spécifiquement invalidé dans le foie. Etant donné l'implication de l'insuline durant la période alimentaire, nous réaliserons ces expériences sur 8 lots de souris : 4 lots de 8 souris qui ne possèdent pas la protéine au niveau du foie et qui sont traitées ou non avec la molécule pharmacologique à l'état de jeûne ou de nourriture, et 4 lots de 8 souris de type sauvage, traitées ou non avec la molécule pharmacologique à l'état de jeûne ou de nourriture.

Dans une deuxième série d'expérience, les animaux seront exposés au froid entraînant comme précédemment une libération d'acides gras du tissu adipeux vers la circulation mais aussi une production de chaleur. Nous comparerons la thermorégulation chez des souris de type sauvage et des souris qui ne possèdent pas la protéine au niveau du foie. Nous réaliserons ces expériences sur 4 lots de souris : 2 lots de 8 souris qui ne possèdent pas la protéine au niveau du foie et qui sont exposées ou non au froid, et 2 lots de 8 souris de type sauvage, exposées ou non au froid.

En fin de protocole, une prise de sang sera effectuée pour doser les lipides circulants et divers paramètres sanguins. Immédiatement après, les animaux seront euthanasiés et leurs organes (foie, tissu adipeux blanc et tissu adipeux brun) seront prélevés afin de conduire des études d'expression de gènes impliqués dans les voies métaboliques. Cette expérience permettra :

- de mettre en évidence le rôle de la voie de signalisation hépatique à l'insuline dans le processus de thermorégulation
- d'étudier le dialogue entre différents organes en réponse à l'insuline : le foie et les tissus adipeux.

Nous utiliserons au total environ 200 animaux, ce qui nous permet de travailler sur des lots de 8 souris par condition, nombre d'animaux minimum nécessaire afin d'obtenir des résultats exploitables. L'ensemble des souris utilisées pour réaliser ces expérimentations sont élevées au laboratoire et sont reproduites entre elles permettant de réduire le nombre d'animaux dans chaque groupe d'expérimentation. L'utilisation de l'animal entier est indispensable puisque nous étudions le dialogue entre plusieurs organes dans la régulation des voies métaboliques. La souris est un modèle de choix pour nos expériences car adapté aux mécanismes que nous étudions et qui nous permet d'invalider une protéine d'intérêt dans un organe en particulier. Nous veillerons au bien-être des animaux tout au long des expérimentations en leur assurant les meilleures conditions d'hébergement, dans un environnement contrôlé et une surveillance par le personnel soignant.

10208 L'expérimentation animale est incontournable pour le développement des recherches dans les secteurs de la biologie, de la médecine et de l'industrie pharmaceutique. Les études biomédicales font appel à des modèles animaux qui visent à mimer au plus près les processus physiologiques et pathologiques rencontrés chez l'humain. Les rongeurs sont des animaux de choix à double titre : d'une part par les facilités d'élevage et de stabulation en animalerie, d'autre part en raison de leur large utilisation (donc documentée).

Depuis une dizaine d'années, de nombreuses modalités d'imagerie développées chez l'être humain ont été adaptées à l'animal de laboratoire. Parmi elles, les techniques d'imagerie isotopique telles

que la Tomographie par Emission de Positron (TEP ou "Positron Emission Tomography : PET") et la Tomographie par émission mono-photonique (TEMP ou "Single Photon Emission Computed Tomography : SPECT") sont devenues une référence pour des études en cancérologie, en neurologie ou encore en cardiologie chez le rongeur. Elles permettent notamment d'obtenir sur un même animal des images 3D sans porter atteinte à son intégrité physique, mais aussi et surtout une détection de haute sensibilité (jusqu'au femtomolaire) et une quantification absolue d'événements moléculaires et/ou métaboliques.

Cet aspect non invasif permet d'envisager des études longitudinales in vivo, qui sont un apport précieux non seulement pour le suivi dans le temps de l'évolution d'une pathologie ou d'un traitement, mais aussi pour répondre aux objectifs de réduction du nombre d'animaux nécessaires à l'atteinte de l'objectif scientifique.

Nous poursuivons 2 objectifs scientifiques et technologiques principaux : i) le développement de nouveaux candidats-imagerie (seront testés : 10 candidats pour les modèles souris et 28 pour les modèles rats) afin d'améliorer la détection et le suivi des pathologies, ii) amener des candidats-médicaments (seront testés : 10 candidats pour les modèles souris et 28 pour les modèles rats) aux phases précliniques de validation, ce qui apporterait de nouvelles possibilités de traitements contre différentes pathologies.

Ainsi, l'utilisation d'animaux est nécessaire pour évaluer les effets validés in vitro, en les validant in vivo dans des modèles de souris et rats. L'absence d'alternative possible pour ce genre de projet rend le recours à l'expérimentation animale incontournable (3R : Remplacement), et le choix de l'espèce par le besoin d'un modèle animal déjà documenté. Des expériences d'imagerie isotopique sont ainsi envisagées chez l'animal (souris/rats) sur des caméras μ SPECT spécifiquement conçues pour adapter cette modalité et ses avantages, à ces espèces.

L'étude sera menée in vivo au total sur 500 souris (*Mus musculus*) et 1440 rats (*Rattus norvegicus*) sur 5 ans : ce nombre nécessaire d'animaux a été calculé pour permettre une étude statistique fiable (3R : Réduction). Les animaux seront hébergés dans des cages ventilées par air filtré, avec enrichissements à types de copeaux, nids et tunnels, avec alimentation et eau ad libitum, dans des locaux Exempts d'Organismes Pathogènes Spécifiques (EOPS) agréés par le Ministère de l'Agriculture, dont la température et l'hygrométrie sont continuellement surveillés par télémétrie (3R : Raffinement).

Les animaux feront l'objet de visites et contrôles au minimum quotidiens par du personnel formé et qualifié, et l'absence d'atteinte de point limite sera surveillée.

10209 L'infarctus du myocarde, appelé couramment crise cardiaque, est une destruction d'une partie du cœur qui se produit lorsqu'une artère coronaire (vaisseau sanguin apportant le sang et l'oxygène au cœur) s'obstrue. Il faut savoir qu'il y a environ 120000 infarctus du myocarde en France tous les ans avec un taux de mortalité autour de 25%. L'angioplastie, technique percutanée permettant de déboucher l'artère coronaire avec la pose d'un stent a contribué à améliorer ce taux. Le stent est un dispositif, le plus souvent métallique, maillé et tubulaire, qui est glissé à l'intérieur de la coronaire et permet de la maintenir ouverte. Néanmoins, une coronaire peut à nouveau se boucher au niveau d'un stent, mais la création de stent "actif" permet de limiter grandement cette réaction indésirable, ce stent diffusant alors une molécule protectrice ou étant recouvert par une molécule empêchant la formation d'un caillot. De nombreux stents sont donc actuellement en cours de développement.

Notre projet prévoit de comparer 3 stents fait du même type d'alliage mais différents au niveau de leur surface qui rentre en contact avec la paroi vasculaire et les éléments du sang circulant : des stents "nus" ne diffusant aucun médicament, des stents "actifs" diffuseur d'un médicament anti-inflammatoire actuellement commercialement disponibles, et des stents "nus" sur lesquelles nous aurons appliqué un nouveau recouvrement que nous souhaitons tester. Ce dernier est basé sur le greffage d'une molécule mimétique du CD31 qui est fortement exprimée par les cellules qui tapissent la face intérieure des artères coronaires. Un premier projet nous a permis d'évaluer le recouvrement par ces cellules (néointima) ainsi que le dépôt de fibrine, plaquettes et leucocytes à la surface luminale des stents, une semaine après l'implantation. Ces premiers résultats encourageants nous poussent à présent à évaluer les bénéfices du recouvrement CD31 à plus long terme, notamment concernant le développement de la néointima qui peut finir par obstruer la

lumière de l'artère stentée et causer finalement l'échec du traitement. Les données obtenues in vitro confirment aussi ces résultats, mais seule l'utilisation in vivo, dans une artère coronaire et en conditions de flux artériel peut permettre d'apprécier les bienfaits espérés de ce recouvrement, avant de pouvoir le tester sur l'Homme. Pour ce projet réalisé in vivo, nous utilisons le porc parce que la fréquence cardiaque, la taille du cœur, l'anatomie coronaire, l'innervation, la circulation collatérale native du porc sont très proches de celle de l'Homme. De plus, le développement de la néointima chez le porc atteint son plateau au bout de seulement 4 semaines.

Ainsi, le plan général de ce nouveau projet est d'anesthésier les animaux afin de poser de manière percutanée 3 stents de même type par animal, de les réveiller et les surveiller pendant 4 semaines afin de permettre le développement maximal de la néointima, puis de les euthanasier afin de récupérer les coronaires et comparer l'épaisseur et la composition de cette néointima par histochimie et microscopie à fluorescence. Afin de limiter au maximum le nombre d'animaux, 2 lot de 3 animaux sont prévus, avec 3 stents de même type par animal. L'anesthésie et l'analgésie seront adaptées afin de n'induire aucune souffrance, et des vétérinaires contrôleront régulièrement l'état de santé des animaux. Ils seront hébergés selon les normes en cours, et nous veillerons à la bonne qualité des soins et à leur bien-être pendant toute l'expérimentation.

10210 L'ouverture de la barrière hémato-encéphalique (BHE) par ultrasons constitue une opportunité de thérapie du cerveau pour le traitement de maladies neurodégénératives. D'une part, en ouvrant les jonctions serrées, cette technique permet le passage dans le cerveau de médicaments qui sans cette action seraient restés dans le système sanguin (ce qui est le cas pour 95% des médicaments disponibles sur le marché). D'autre part, même en l'absence de toute co-administration de médicaments, cette même technique permet le passage d'anticorps endogènes, molécules normalement trop volumineuses pour cela. Cela induit une réponse auto-immune dans les zones atteintes par la maladie. L'efficacité de cette technique a déjà été prouvée sur des modèles de souris Alzheimer. Nous voulons ici évaluer la possibilité de traiter d'autres maladies neurologiques (en particulier la maladie de Parkinson) en ouvrant la BHE par ultrasons : en focalisant les ondes ultrasonores dans le cerveau à travers la boîte crânienne, il est possible de concentrer de manière très précise les ultrasons dans une zone millimétrique et d'ouvrir localement et transitoirement la BHE.

On évalue à 6,3 millions le nombre de personnes atteintes par la maladie de Parkinson à travers le monde dont plus de 150 000 personnes en France et environ 8 000 nouveaux cas se déclarent chaque année.

Nous allons premièrement tester un nouveau traceur de l'ouverture de la BHE, plus précis que ceux actuellement utilisés. Après application des ultrasons, il permettra de localiser, à l'échelle du neurone, les zones du cerveau concernées par l'ouverture de BHE. Ensuite nous appliquerons la thérapie transcrânienne par ultrasons à des souris parkinsoniennes afin d'évaluer une éventuelle amélioration du comportement et une réduction des signes de la maladie dans le cerveau.

L'utilisation des animaux est indispensable pour valider notre étude : ni l'ouverture de barrière ni la maladie de Parkinson ne peut être modélisé autrement.

L'étude se déroulera en réduisant au maximum le nombre d'animaux par l'analyse statistique préalable sur la taille des groupes requise pour réaliser l'étude dans le but d'une obtention de résultats significatifs.

L'ouverture transcrânienne de la barrière hémato-encéphalique constitue en elle-même une procédure de raffinement permettant l'action de molécules sur le cerveau qui, sans cette technique, seraient injectées de façon invasive et après craniotomie.

Le projet prévoit au minimum 50 et au maximum 190 souris nées et élevées dans des élevages agréés. Le nombre d'animaux est réduit au minimum nécessaire tout en restant compatible avec l'utilisation de tests statistiques non paramétriques pour permettre l'interprétation des résultats. Le bien-être des animaux sera assuré tout au long de leur manipulation, depuis les conditions d'hébergement jusqu'à la minimisation de la douleur lors des procédures expérimentales, la procédure sera stoppée en cas de stress ou douleur non contrôlé, non traitée. A leur arrivée les animaux auront une semaine d'acclimatation pour s'adapter à leur nouvel environnement. Une surveillance quotidienne des paramètres environnementaux (tels que la lumière, la température et

l'hygrométrie, le pH de l'eau...) est réalisée au sein de l'animalerie. Les animaux seront hébergés en groupe de 5 souris dans des cages ventilés enrichis avec un nid.

10211 L'objectif de notre projet est d'évaluer l'effet dose d'un nouveau composé administré par voie orale à 4 doses différentes en comparaison avec un antidiabétique de référence (Ascarbose) 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.

Un composé, sélectionné sur la base d'études réalisées in vitro, et dont les études de toxicité réalisées ont montré son innocuité, a été retenu pour être testé chez l'animal.

Pour réaliser ce projet, 84 souris mâles diabétiques (db/db) âgées de 6 à 8 semaines seront nécessaires. Elles seront nourries pendant toute l'étude avec un régime spécial pour entretenir leur pathologie.

Les 84 souris seront réparties en 7 groupes de 12 animaux chacun et elles seront traitées par gavage avec soit de l'eau de source, le véhicule de mise en solution du composé testé, le composé testé à 4 doses différentes ou l'Ascarbose, antidiabétique de référence à une dose équivalente à l'une des 4 doses du composé à tester.

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 débiteront après une période d'acclimatation de 7 jours.

Afin de répartir de façon homogène les animaux dans les différents groupes de traitement 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 (procédure expérimentale 1) et la mesure de glycémie 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 (procédure expérimentale 2).

La veille du premier traitement, les animaux seront mis à jeun en fin de journée. Le lendemain matin, le traitement oral sera réalisé (procédure expérimentale 3) 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 ainsi effectuées sur l'ensemble des animaux et les traitements oraux seront effectués pendant 14 jours consécutifs.

Les solutions de composé à administrer aux 4 doses à tester et d'Ascarbose seront préparées chaque jour de traitement dans une solution de saccharose.

Après la dernière mesure de glycémie, les animaux seront euthanasiés 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 (perte de poids de plus de 15% sur 3 jours ou de plus de 20% du poids maximum atteint au cours de l'étude) ou des modifications du comportement

des animaux sont observés (agressivité, cachexie, tremblements, paralysie, vocalises...), ceux-ci seront euthanasiés 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 dans nos conditions expérimentales (Réduction).

10212 Ce projet a pour but de tester l'efficacité d'ingrédients alimentaires d'origine végétale sur le développement de maladies nutritionnellement induites telles que l'obésité (induite par un régime hyperlipidique), l'hypercholestérolémie (induite par un régime hypercholestérolémique), le pré diabète (induit par un régime riche en carbohydrate et/ou en lipide) ou l'inflammation colique légère (induite par un régime hyperprotéique).

Les différents ingrédients à tester sont choisis en fonction de la thématique (fibres solubles et/ou non-solubles dans le cas du pré diabète...). Les doses et les temps d'administration sont choisis en fonction de la littérature, par exemple, huit semaines de supplémentation à 5 ou 10% dans l'aliment pour voir l'effet d'ingrédients sur le développement de l'hypercholestérolémie.

Aucun remplacement n'est possible pour les protocoles décrits dans ce projet car l'induction de maladies nutritionnelles constitue une réponse physiologique complexe qui ne peut pas être mimée in-vitro ou ex-vivo. Les effectifs sont fixés de 10 à 12 animaux par groupe. Nous prévoyons d'impliquer un maximum de 252 rats, 252 souris et 252 hamsters. D'après la littérature, les réponses à ce genre de traitement face à une maladie nutritionnellement induite est une modulation de 20% du biomarqueur choisi comme critère principal d'étude (cholestérol total dans le cas de l'hypercholestérolémie, cytokine de l'inflammation au niveau de la muqueuse colique ou glycémie à jeun dans le cas de l'étude du développement du pré diabète) (réduire). L'effectif de chaque groupe a donc été calculé pour assurer, dans la mesure du possible, la significativité statistique et pour limiter le nombre d'animaux utilisés (réduire). L'impact physiologique d'un dérèglement nutritionnel est donc étudié au travers de ce projet, aucune technique de remplacement n'est donc possible. Afin de limiter la douleur, la souffrance et l'angoisse des animaux, ils sont placés à 2 au minimum par cage dans des conditions de stabulation classiques en dehors des périodes de procédure expérimentale, l'utilisation d'anesthésiants adéquats est mise en place lors des prélèvements sanguins, les animaux sont manipulés quotidiennement dans un environnement calme par du personnel formé (raffiner).

Les différentes études incluses dans ce projet pourront permettre de démontrer l'efficacité de certains ingrédients alimentaires dans le cadre de la prévention ou de la réduction de biomarqueurs symptomatiques de maladies ayant des origines nutritionnelles. Dans la plupart des cas, il s'agira de tester l'efficacité de nos ingrédients par rapport à ce qui a été publié sur une gamme de macro-ou micronutriments (notre fibre versus « les fibres » en général). Ce projet préclinique sur animal nous permettra de cribler l'efficacité ainsi que les doses efficaces de certains de nos ingrédients avant de d'envisager le stade clinique nécessaire à la construction d'un dossier EFSA pour l'obtention d'une allégation santé.

10213 Parmi les cancers hépatiques, les carcinomes hépatocellulaires (CHC) sont les tumeurs primaires les plus fréquentes (90%). Ils représentent actuellement la deuxième cause de mortalité liée au cancer au monde. Dans les pays occidentaux, les facteurs étiologiques principaux sont des infections chroniques par les virus de l'hépatite C et la consommation abusive d'alcool mais plus récemment l'obésité (suite à une sédentarisation et une alimentation plus riche). Le taux de survie à 5 ans des patients atteints d'un CHC n'excède pas 20% et la chirurgie qui reste le principal traitement curatif ne concerne qu'une minorité d'entre eux (~30%). La chimiothérapie ne confère quant à elle que quelques mois de survie supplémentaires. Afin de proposer de nouvelles thérapies efficaces il est donc indispensable de décrypter les mécanismes moléculaires impliqués. L'expérimentation animale est nécessaire de par la relation complexe qui existe entre les différents types cellulaires présents au sein d'une tumeur et les paramètres physiologiques ne pouvant être reproduits in vitro. Plusieurs modèles murins de cancer du foie ont été développés et ont permis entre autres d'identifier des mutations d'un oncogène retrouvée dans les CHC humains. Des

mutations de cet oncogène sont un des principaux évènements retrouvés dans le développement de CHC chez l'homme. Un modèle murin reproduisant fidèlement cette pathologie a été développé par notre équipe. Il a permis d'identifier des modifications métaboliques accompagnant la tumorigenèse due à l'activation anormale de cet oncogène. Ces modifications métaboliques font partie intégrante du processus oncogénique et notre programme de recherche consistera à comprendre leurs mécanismes et leur rôle dans la transformation tumorale. Afin de respecter la règle des 3R, le nombre d'animaux utilisé sera réduit à son minimum permettant des analyses statistiques valables. Afin de mener à bien cette étude, nous prévoyons l'utilisation de 72 souris sur une période de 4 ans. Pour limiter l'angoisse et la souffrance animale, une surveillance quotidienne sera réalisée, intensifiée pendant les phases potentiellement délétères et en respectant des points limites définis, au-delà desquels les animaux recevront un analgésique ou seront euthanasiés. Les protocoles d'induction de tumeurs que nous utilisons sont génétiques et n'entraînent pas de souffrance. Les analyses potentiellement stressantes se feront sous anesthésie générale. Nous suivrons le développement tumoral par une approche non invasive, l'échographie, qui permet une étude longitudinale, limitant très fortement le nombre d'animaux nécessaires et surtout permettant de suivre la croissance tumorale. Cette méthode permet de faire nos études sur des tumeurs de petite taille, à des stades précoces, ce qui évite ainsi la souffrance engendrée par un développement tumoral important.

En parallèle, des méthodes alternatives utilisant des cellules primaires issues de ces souris seront utilisées pour analyser les mécanismes moléculaires. Cette approche *in vitro* permet aussi de tester de nombreux effecteurs sur une même culture et donc limite le nombre d'animaux. A terme cette étude permettra le développement de nouvelles approches/stratégies thérapeutiques ciblant spécifiquement cette classe de CHC actuellement incurables. Notre hypothèse est que la reprogrammation métabolique et le stress oxydatif potentiellement associé à cette reprogrammation ont un effet majeur dans la carcinogenèse hépatique. A terme cette étude devrait permettre le développement de nouvelles approches et stratégies thérapeutiques ciblant spécifiquement cette classe de CHC qui manque cruellement d'options thérapeutiques à l'heure actuelle.

10214 L'expérimentation animale est incontournable pour le développement des recherches dans les secteurs de la biologie, de la médecine et de l'industrie pharmaceutique. Les études biomédicales font appel à des modèles animaux qui visent à mimer au plus près les processus physiologiques et pathologiques rencontrés chez l'humain. Les rongeurs sont des animaux de choix à double titre : d'une part par les facilités d'élevage et de stabulation en animalerie, d'autre part en raison de l'avènement des techniques de manipulations génétiques chez la souris.

Depuis une dizaine d'années, de nombreuses modalités d'imagerie développées chez l'être humain ont été adaptées à l'animal de laboratoire. Parmi elles, les techniques d'imagerie isotopique telles que la Tomographie par Emission de Positron (TEP ou "Positron Emission Tomography : PET") et la Tomographie par émission mono-photonique (TEMP ou "Single Photon Emission Computed Tomography : SPECT") sont devenues une référence pour des études en cancérologie, en neurologie ou encore en cardiologie chez le rongeur. Elles permettent notamment d'obtenir sur un même animal des images 3D sans porter atteinte à son intégrité physique, mais aussi et surtout une détection de haute sensibilité (jusqu'au femtomolaire) et une quantification absolue d'évènements moléculaires et/ou métaboliques.

Cet aspect non invasif permet d'envisager des études longitudinales *in vivo*, qui sont un apport précieux non seulement pour le suivi dans le temps de l'évolution d'une pathologie ou d'un traitement, mais aussi pour répondre aux objectifs de réduction du nombre d'animaux nécessaires à l'atteinte de l'objectif scientifique.

Nous poursuivons 2 objectifs scientifiques et technologiques principaux : i) le développement de nouveaux candidats-imagerie afin d'améliorer la détection et le suivi des pathologies, ii) amener des candidats-médicaments aux phases précliniques de validation.

Le recours à l'expérimentation animale se justifie par l'impossibilité réglementaire de conduire ce type de recherche chez l'homme sain, et le choix de l'espèce par le besoin d'un modèle animal déjà documenté, en l'absence d'alternative possible (3R : Remplacement). Des expériences d'imagerie

isotopique sont ainsi envisagées chez l'animal (souris/rats) sur des caméras μ TEP spécifiquement conçues pour adapter cette modalité et ses avantages, à ces espèces.

L'étude sera menée in vivo au total sur 1300 souris (*Mus musculus*) et 520 rats (*Rattus norvegicus*) sur 5 ans : ce nombre nécessaire d'animaux a été calculé pour permettre une étude statistique fiable (3R : Réduction). Les animaux seront hébergés dans des cages ventilées par air filtré, avec enrichissements à types de copeaux, nids et tunnels, avec alimentation et eau ad libitum, dans des locaux Exempts d'Organismes Pathogènes Spécifiques (EOPS) agréés par le Ministère de l'Agriculture, dont la température et l'hygrométrie sont continuellement surveillés par télémetrie (3R : Raffinement).

Les animaux feront l'objet de visites et contrôles au minimum quotidiens par du personnel formé et qualifié, et l'absence d'atteinte de point limite sera surveillée.

Pendant l'imagerie, l'animal est anesthésié (isoflurane 1.5%) avec suivi de son rythme respiratoire. L'animal est réchauffé par une table ou couverture chauffante afin de prévenir l'hypothermie due à l'anesthésie.

Le radiotracer, dénué d'effet pharmacologique, est injecté à une micro-dose (le but étant de cibler une fonction et non d'induire un effet pharmacologique), par voie intraveineuse (au maximum 0.1mL).

10215 Le système d'horloge interne, ou rythme circadien régule les réponses immunitaires aux microbes et la susceptibilité à l'infection dépend de « l'heure du jour ». Ceci suggère que l'horloge interne contrôle la réplication virale. Cependant, les mécanismes sous-jacents ne sont pas bien définis. L'infection virale du foie par le virus de l'hépatite B (VHB) est un problème mondial de santé, avec environ 300 millions d'individus infectés chroniquement par le virus qui malgré l'existence d'un vaccin prophylactique restent susceptibles de développer une maladie du foie (cirrhose, carcinome hépatocellulaire). Le foie est le réservoir de ces virus de l'hépatite B et est un tissu présentant un rythme circadien où jusqu'à 20% des gènes sont régulés via un complexe de protéines spécifiques de ce cycle. Ce complexe est lui-même coordonné par les protéines REV-ERBa et b. Nous avons déjà démontré in vitro le rôle important de ce complexe dans le contrôle de plusieurs étapes du cycle viral du VHB. En outre, des composés synthétiques se fixant à et activant REV-ERBa ont montré une activité antivirale puissante contre le VHB. Cela souligne le rôle thérapeutique potentiel pour des agents modulateurs du cycle circadien pour traiter ou prévenir une infection virale. Nous souhaitons donc utiliser le modèle de souris chimériques humanisées au niveau du foie FRG-NOD et supportant une infection par le VHB pour, dans un premier temps, évaluer le changement du rythme circadien hépatique induit par l'infection par le VHB. Dans un deuxième temps, nous évaluerons l'innocuité d'une molécule activant REV-ERBa afin de s'assurer qu'elle n'induit pas de toxicité chez nos souris FRG-NOD humanisées. Et enfin, si aucune toxicité n'est induite par celle-ci, nous évaluerons le potentiel antiviral de cette molécule activant REV-ERBa dans le traitement de l'infection chronique par le VHB. Ainsi nos souris chimériques au foie humanisé seront infectées de façon persistante par le VHB puis traitées par la molécule agoniste afin de déterminer son effet sur la charge virale du VHB.

Remplacement : Afin de s'assurer de la nécessité de réaliser des tests sur animaux, de nombreuses expériences ont été réalisées en amont in vitro sur des modèles cellulaires. L'étude du cycle circadien et de l'impact de l'infection par le VHB reste très artificielle en modèle cellulaire. Seule l'utilisation d'animaux véritablement soumis à un cycle régulier avec des périodes lumière/obscurité constantes peut permettre d'étudier finement le dérèglement de ce cycle dans le cas d'infections VHB chroniques. Réduction : Un nombre de 82 animaux et une dizaine de couples reproducteurs, soit 102 animaux, devraient être nécessaire afin de mener à bien ce projet. Afin de réduire au maximum ce nombre, nous n'utiliserons qu'un nombre minimum d'animaux afin d'obtenir des données scientifiques et statistiques interprétables. De plus, si la molécule activant REV-ERBa se montre toxique pour nos souris humanisées, nous ne poursuivrons pas l'expérience sur souris infectées. Raffinement : Afin de raffiner au mieux notre méthodologie le protocole expérimental est planifié en amont, l'environnement des animaux est enrichi, si besoin un analgésique dont la durée d'action s'étend au-delà de 24h est utilisé, des points limites que sont l'apparition de signes de mal être et de douleur, persistant au-delà de 48h suite à l'injection d'un analgésique sont appliqués et

une méthode d'euthanasie appropriée est utilisée. Si la molécule activant REV-ERBa se montre toxique pour nos souris humanisées, nous ne poursuivrons pas l'expérience sur souris infectées. Néanmoins, cette molécule a déjà été utilisée dans des modèles classiques de souris et n'a pas montré de toxicité particulière. Mais son innocuité reste à montrer dans ce modèle de souris chimériques FRG-NOD. De plus, l'infection par le VHB n'entraîne pas dans ce modèle de signes de douleurs ou de mal être. De plus, les données obtenues sur les animaux seront analysées avec des tests statistiques classiques ANOVA, t-test, Mann-Whitney.

10216 Les neurones sont les cellules responsables de la transmission des signaux entre les différents membres, organes du corps et le cerveau ainsi qu'au sein même du cerveau. Cette transmission est réalisée grâce aux prolongations cellulaires des neurones appelées axones qui entrent en contact avec les autres cellules par des excroissances appelées épines. Lorsque que nous effectuons des exercices de mémorisations, la transmission des informations passe par ces neurones, véhiculent via les axones puis leurs épines, enfin ces informations sont enregistrées et stockées dans le cerveau. La régulation du nombre d'épines, élément final de passage d'information, est essentielle pour l'adaptation du cerveau aux divers contextes de mémorisation, il est donc important d'étudier cette dynamique puisqu'il a été montré qu'un dysfonctionnement de ces épines entraîne des troubles cérébraux tels que les troubles autistiques et la maladie d'Alzheimer.

Le projet de cette formation est de montrer les nouvelles techniques d'imagerie in vivo qui permettent d'observer et d'étudier la dynamique des échanges neuronaux en condition physiologique sur l'animal vivant et de pouvoir suivre leur évolution sur plusieurs jours consécutifs. Les animaux de ce projet subiront une chirurgie (pose d'une fenêtre crânienne) suivie 4 semaines après, de sessions d'imagerie tous les 2 jours pendant une dizaine de jours.

Ce projet sera réalisé sur des souris génétiquement modifiées Thy1-YFP-H (exprimant une protéine fluorescence dans les neurones, non dommageable pour l'animal) -tous sexes confondus- (20 souris par formation) à raison d'une fois par an sur une durée de 5 ans (soit 100 souris total).

Afin de respecter la règle des 3R, une même souris sera utilisée pour mesurer plusieurs paramètres lorsque cela sera possible. Des procédures opératoires seront développées de façon à réduire au maximum l'inconfort de l'animal. Il est important de noter i) Réduction : il nous est nécessaire de démontrer les techniques puis de les faire pratiquer par les étudiants, nous ne pouvons donc pas travailler avec moins d'animaux ; ii) Raffinement : les méthodologies utilisées dans ce projet impliquent la mise en œuvre de toutes les stratégies expérimentales et pharmacologiques disponibles actuellement pour réduire le nombre d'animaux utilisés mais aussi minimiser les possibles effets délétères pour ceux-ci, avec un respect particulier de la notion de points limite (critères d'interruption en cas de souffrance des animaux) ; (iii) Remplacement : le lien entre la dynamique des épines et leurs fonctions avec les autres structures cérébrales, ne peut être étudié avec des modèles in vitro de neurones en culture, nous ne pouvons donc pas remplacer ce modèle animal.

Ce projet a pour but de former des étudiants afin qu'ils soient en mesure de réaliser au mieux les procédures qu'ils auront apprises et transmettre ainsi ces techniques dans leur laboratoire d'origine. Une meilleure connaissance des nouvelles techniques de chirurgie et d'imagerie leur permettra de réduire le nombre d'animaux utilisés lorsqu'ils voudront réaliser ces techniques pour leurs besoins de recherche.

10217 Ces travaux pratiques (TP) chez le rat sont destinés à des étudiants dont la formation peut conduire à des métiers en lien avec le domaine de l'expérimentation animale. Dans ce contexte, les étudiants doivent acquérir un savoir-faire pour participer aux essais chez l'animal vigile et être en mesure de réaliser entre autres les traitements et les observations cliniques des animaux, afin de pouvoir candidater sur les postes proposés par les organismes publics ou privés de recherche. D'autre part, cet enseignement pratique participe à une meilleure orientation de nos étudiants par la découverte concrète des exigences et responsabilités liées à l'utilisation de l'animal. Les objectifs pédagogiques de ces travaux pratiques sont les suivants :

- Mettre en pratique l'enseignement théorique à la fois d'un point de vue pharmacologique concernant les effets des neuroleptiques classiques (médicaments psychotropes) et d'un point de vue éthique vis-à-vis de l'utilisation de l'animal en expérimentation.

- Savoir mettre en application un protocole expérimental de pharmacologie in vivo comme demandé dans le programme pédagogique et réaliser un tableau de recueil de données approprié au déroulement de ce protocole pour garantir la traçabilité des données brutes expérimentales.

- Utiliser un test de comportement chez l'animal pour mettre en évidence la propriété caractéristique des neuroleptiques classiques à induire une catalepsie. Quantifier l'activité pharmacologique de la chlorpromazine (neuroleptique classique) selon une relation dose/effet dans le cas d'un test répondant à loi du tout ou rien (absence ou présence de catalepsie).

- Consolider la manipulation du rat vigile (contention, administration par voie intrapéritonéale) avant l'apprentissage de la technique d'administration sous l'aponévrose plantaire réalisée dans le TP suivant concernant l'étude d'un anti-inflammatoire.

Réduction : Chaque promotion, de 50 étudiants au maximum, est divisée en 2 groupes de 25 étudiants. Par conséquent, ce TP aura lieu sur 2 séances (1 séance par groupe d'étudiants, encadrés par 2 enseignants). Les étudiants seront répartis par binôme et un seul animal sera utilisé par étudiant. A chaque séance, 3 lots expérimentaux seront constitués (1 lot pour chaque dose testée du neuroleptique). Les 3 doses seront réparties entre les différents binômes de telle sorte que les 2 étudiants d'un même binôme ne testent pas la même dose. Un animal non traité par la chlorpromazine ne pouvant être cataleptique aucun lot contrôle ne sera constitué. Afin de réduire le nombre d'animaux, les rats inclus dans ce TP auront déjà été utilisés la semaine précédente dans un 1er protocole concernant le suivi d'une anesthésie générale. Cette réutilisation des animaux a été validée par le vétérinaire référent et sera réalisée selon ses recommandations. De même les rats supplémentaires du 1er protocole (maximum 5 rats) ainsi que les 4 rats affectés à la démonstration des gestes techniques par les enseignants pourront être réutilisés au cours du présent TP en cas de problème particulier (exemple : rat dont l'état de santé ne permettrait pas son intégration à ce nouveau protocole expérimental).

Ainsi tous les animaux utilisés dans ce TP (59 par an pour 50 étudiants soit 295 pour 5 ans) seront issus du 1er TP concernant l'anesthésie générale. Ces animaux proviendront de notre propre élevage et afin de limiter au maximum la présence d'animaux surnuméraires des rats mâles et femelles seront utilisés indifféremment tout en respectant l'attribution d'un même sexe pour une séance de TP. De plus, pour l'analyse des résultats, les réponses au test de catalepsie obtenues pour l'ensemble des binômes au cours d'une séance de TP seront regroupées permettant ainsi de limiter le nombre d'animaux utilisés par binôme.

Raffinement : les animaux seront hébergés par groupes socialement harmonieux dans des cages appropriées à l'espèce, en nombre adapté, et en présence d'un enrichissement comprenant 2 éléments (tunnel en plastique noir et bâtonnet en bois à ronger ou noix).

Préalablement aux séances de TP, les animaux seront habitués à la préhension et à la contention afin de limiter leur stress lors de leur utilisation par les étudiants. Ces animaux ayant été utilisés dans un précédent protocole, une semaine de récupération sera laissée aux animaux avant de les introduire dans le présent TP. Cette réutilisation validée par le vétérinaire référent se fera selon ses recommandations.

Remplacement : Dans le cadre de la formation de nos étudiants, le Programme Pédagogique National prévoit, en pharmacologie, l'évaluation in vivo des effets et du mode d'action de molécules de référence par la mise en œuvre de protocoles expérimentaux.

Ce TP doit permettre d'une part d'illustrer les effets des neuroleptiques classiques et d'évaluer in vivo la relation effet/dose de la molécule étudiée et d'autre part de renforcer l'apprentissage par nos étudiants de la manipulation du rat vigile (contention, administration par voie intrapéritonéale) avant d'aborder la technique d'administration sous l'aponévrose plantaire dans le TP suivant. Par ailleurs, le programme pédagogique précise pour nos étudiants que l'un des prolongements possibles à cette formation en pharmacologie in vivo est l'habilitation à participer à des expérimentations animales de niveau praticien (formation réglementaire que nous proposons aux étudiants intéressés). Il n'existe à l'heure actuelle aucune méthode de remplacement permettant une formation appropriée de nos étudiants tant sur le plan pharmacologique (observation et

quantification des effets de la substance étudiée) que sur le plan technique (manipulation de l'animal vigile, administration de substances chez l'animal vigile...).

10218 L'expérimentation animale est incontournable pour le développement des recherches dans les secteurs de la biologie, de la médecine et de l'industrie pharmaceutique. Les études biomédicales font appel à des modèles animaux qui visent à mimer au plus près les processus physiologiques et pathologiques rencontrés chez l'humain. Les rongeurs sont des animaux de choix à double titre : d'une part par les facilités d'élevage et de stabulation en animalerie, d'autre part en raison de l'avènement des techniques de manipulations génétiques chez la souris.

Depuis une dizaine d'années, de nombreuses modalités d'imagerie développées chez l'humain ont été adaptées à l'animal de laboratoire. Parmi elles, l'imagerie ultrasonore permet l'étude haute résolution des organes mous et peu profonds de la souris de façon non invasive et en temps réel. En plus de l'imagerie anatomique qui peut être en 3D, des informations quantitatives fonctionnelles sont possibles avec l'imagerie Doppler.

Les systèmes ultrasonores présentent l'avantage d'être relativement peu encombrants mais surtout d'être non invasif pour l'animal.

Nous poursuivons donc l'objectif scientifique d'amener des candidats-médicaments aux phases précliniques de validation. L'échographe que nous utilisons est commercial et paramétré comme non lésionnel chez l'animal.

Des expériences d'imagerie par échographie sont ainsi envisagées chez l'animal (souris/rats). Cet aspect non invasif permet d'envisager des études longitudinales in vivo, qui sont un apport précieux non seulement pour le suivi dans le temps de l'évolution d'une pathologie ou d'un traitement, mais aussi pour répondre aux objectifs de réduction du nombre d'animaux nécessaires à l'atteinte de l'objectif scientifique. Pour la recherche préclinique cardiovasculaire (généralement chez le rat), l'échographie à ultra-haute fréquence, permet d'effectuer des échocardiogrammes fiables pour la recherche translationnelle chez les petits animaux in vivo avec une résolution jusqu'à 40 microns et offrant une meilleure résolution temporelle et spatiale par rapport à l'IRM, aux ultrasons conventionnels et à la tomodensitométrie.

Il est donc possible d'utiliser l'échographie dans différents modèles de maladie cardiaque : Infarctus du myocarde, Cardiotoxicité, Maladie valvulaire, Hypertrophie cardiaque et Cardiomyopathie.

Pour la recherche préclinique cancérologie (généralement chez la souris), l'échographie permet des injections guidées pour la mise en place de tumeurs orthotopiques, effectuer des dépistages à haut débit pour la croissance tumorale et détecter et surveiller la croissance et la réponse des tumeurs au traitement dans des modèles précliniques de suivi longitudinal in vivo. L'échographe permet d'évaluer avec précision la taille et le volume de la tumeur et l'obtention de l'imagerie du microenvironnement tumoral (angiogenèse, hypoxie, les marqueurs moléculaires et l'administration des médicaments).

Il est donc possible d'utiliser l'échographie dans différents modèles en oncologie afin d'acquérir des connaissances sur divers modèles de tumeurs, y compris : Tumeurs pancréatiques orthotopiques, Tumeurs du sein, Cancer de la prostate et de l'ovaire, Tumeurs de la vessie, Gliomes, xénogreffes dérivées de patients.

Quel que soit l'organe ou la pathologie étudiée, les contraintes seront les mêmes pour l'animal : anesthésie, temps de procédure d'imagerie, réveil.

L'étude sera menée in vivo au total sur 1300 souris (*Mus musculus*) et 520 rats (*Rattus norvegicus*) sur 5 ans : ce nombre nécessaire d'animaux a été calculé pour permettre une étude statistique fiable (3R : Réduction). Les animaux seront hébergés dans des cages avec enrichissements à types de copeaux, nids et tunnels, avec alimentation et eau ad libitum (3R : Raffinement). Les animaux seront hébergés dans des cages ventilées par air filtré, avec enrichissements à types de copeaux, nids et tunnels, avec alimentation et eau ad libitum, dans des locaux Exempts d'Organismes Pathogènes Spécifiques (EOPS) agréés par le Ministère de l'Agriculture, dont la température et l'hygrométrie sont continuellement surveillés par téléométrie (3R : Raffinement).

Les animaux feront l'objet de visites et contrôles au minimum quotidiens par du personnel formé et qualifié, et l'absence d'atteinte de point limite sera surveillée.

Pendant l'imagerie, l'animal est anesthésié (isoflurane 1.5%) et la respiration et la fréquence cardiaque sont suivies.

L'animal est réchauffé par du gel d'échographie (lui-même chauffé) et est disposé sur une table chauffante pendant toute la durée de la procédure ce qui permet de maintenir sa température interne et de lutter contre l'hypothermie due à l'anesthésie.

10219 La Leucémie Myéloïde Chronique (LMC) est un cancer du sang dû à l'apparition d'une anomalie dans la cellule souche sanguine, cellule à l'origine des différentes cellules du sang. Cette anomalie correspond à la fusion de deux morceaux de chromosomes induisant la création d'un gène de fusion : le gène BCR-ABL1. La présence du gène BCR-ABL1 entraîne une surproduction de globules blancs (un des premiers symptômes de la LMC). Notre projet concerne la recherche de traitements adjuvants qui pourraient renforcer l'efficacité des traitements actuels utilisés dans la LMC, les inhibiteurs de tyrosine kinases (ITK). En effet, si les ITK sont efficaces pour éliminer les cellules différenciées BCR-ABL1+, ils n'agissent pas sur les cellules les plus primitives (les cellules souches leucémiques). Ces cellules perdurent donc, et sont responsables d'une persistance de la maladie, et d'éventuelles rechutes à l'arrêt du traitement. Il a donc été proposé de "réveiller" les cellules souches leucémiques afin qu'elles deviennent sensibles et puissent être éliminées par les ITK. C'est ce que nous voulons faire, en utilisant indirectement la capacité du système nerveux sympathique à activer la prolifération des cellules souches hématopoïétiques. L'essentiel du projet consiste à activer les récepteurs beta-adrénergiques de la moelle osseuse par des agents pharmacologiques (agonistes sélectifs ou non sélectifs), et à mesurer l'effet induit sur le nombre, l'état et la prolifération des cellules souches hématopoïétiques normales (dans un premier temps) mais également sur les cellules leucémiques. De plus, ce projet nous permettra d'étudier les effets induits par les cellules leucémiques sur l'hématopoïèse normale.

Pour réaliser ce projet, nous estimons avoir besoin de 840 souris sur 3 ans.

Dans le respect de la règle des 3R :

Remplacement : L'hématopoïèse normale ou leucémique sont des modèles intégrés qui font intervenir un grand nombre de mécanismes physiologiques et de tissus avoisinants qui ne peuvent être modélisés in vitro. Nous devons donc avoir recours à un modèle physiologique complet et fonctionnel.

Réduction : Nous combinerons nos lots témoins dans le but de restreindre le nombre d'animaux.

Raffinement : Le bien-être de nos animaux sera pris en compte de leur naissance à leur mort, les animaux seront hébergés en groupe et l'enrichissement de leur milieu de vie sera systématique. Les animaux recevront une surveillance quotidienne et des soins adaptés (administration d'analgésiques et anesthésiques en pré et/ou post-opératoire, mesure hebdomadaire du poids des souris, définition de points limites suffisamment précoces et mise en place de critères d'arrêt).

10220 Des données humaines et animales sont en faveur d'effets délétères de certains toxiques chimiques environnementaux sur la reproduction féminine, notamment la production des ovules, et sur le développement de l'embryon avant son implantation, 2 phases très sensibles à l'environnement extérieur. Toutefois très peu d'études ont cherché à connaître l'effet d'un mélange de toxiques alors qu'il est prouvé que l'Homme est exposé à des dizaines de toxiques de l'environnement.

Par exemple, plusieurs études ont montré la présence de dizaines de toxiques chez la femme enceinte, c'est le concept du bébé prépollué (avant même sa naissance).

Nous allons exposer des lapines à un mélange de 9 toxiques environnementaux choisis pour représenter 5 grandes familles de toxiques environnementaux présentes quasi systématiquement pendant la grossesse : le dichlorodiphényldichloroéthylène (DDE), l'hexachlorobenzène (HCB) et le β -Hexachlorocyclohexane (β -HCH) pour les organochlorés, le 2,2',4,4'-Tetrabromodiphenyl ether (BDE 47) et le 2,2',4,4',5,5'-hexa-bromodiphenyl ether (BDE 153) pour les diphenyléthers bromés (retardateurs de flammes), le di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) pour les phtalates et le bisphenol S.

L'exposition sera effectuée par voie orale durant la production d'ovule \pm le développement préimplantatoire de l'embryon afin d'évaluer si cette exposition les affecte. De plus des embryons obtenus après exposition seront transférés dans des femelles porteuses afin d'évaluer les effets de

l'exposition sur le développement du fœtus et du placenta ainsi que sur la santé à long terme de la descendance.

Le lapin a été choisi comme modèle car il présente plus de similitudes avec l'Homme que la souris ou le rat pour les processus étudiés (production d'ovules et développement embryonnaire préimplantatoire).

Réduction : Le nombre total d'animaux nécessaire est estimé à 307. Ce chiffre est basé sur des calculs d'effectifs établis pour pouvoir mettre en évidence pour chaque critère étudié un effet présumé de l'exposition avec une puissance statistique valable.

Remplacement : Pour réaliser ces études complexes et importantes pour comprendre l'impact des polluants sur la reproduction humaine, il est indispensable d'avoir recours à l'expérimentation animale. Il n'y a pas d'autre moyen pour analyser la qualité des ovules que d'étudier des ovules, ou pour étudier les capacités d'un embryon à se développer que de le transférer dans un utérus receveur. Le modèle lapin est celui qui est le plus pertinent.

Raffinement : Les 307 lapines seront hébergées dans des cages garantissant une densité par animal compatible avec les normes du bien-être animal. Elles disposeront d'une plateforme pour pouvoir bondir, ainsi que d'éléments ludiques. Les lapines auront à leur disposition des chainettes ou des morceaux de bois non traités pour pouvoir ronger. Elles seront en petit groupe sauf pendant les phases de reproduction ou de prélèvements afin que les animaux ne se blessent pas entre eux. Les lapines hébergées individuellement resteront toutefois en contact auditif et olfactif avec leurs congénères. Ces lapines seront manipulées par des personnes formées et expérimentées. Les prélèvements de sang répétés (30 lapines) seront réalisés après la pause d'un cathéter, afin d'éviter de piquer chaque animal plusieurs fois. Les opérations de transfert d'embryons seront pratiquées sous anesthésie générale par des personnes formées à la chirurgie et aux soins vétérinaires. Elles bénéficieront de traitements antidouleur et antibiotique. Le traitement antibiotique (Zuprevo) aura pour but d'éviter toute contamination de la plaie par des staphylocoques ou des pasteurelles. Il consiste en une seule injection qui couvre l'animal pour environ 3 semaines.

Si un animal présente des signes de maladie, il sera traité et retiré du dispositif si son état de santé n'est plus compatible avec l'expérience.

10221 Avec plus de 8.8 millions de décès recensés en 2015 (OMS, 2017) le cancer représente aujourd'hui la seconde cause majeure de mortalité dans le monde. Malgré l'amélioration des méthodes de prévention et de traitement, la formation de métastases au cours de cette pathologie reste la première cause de mortalité chez les patients atteints de cancer. Les métastases se forment par un long processus faisant intervenir plusieurs étapes, notamment 1) l'invasion des cellules tumorales à travers le tissu d'origine 2) la dissémination dans la circulation sanguine ou lymphatique, 3) l'adhérence à la paroi des vaisseaux sanguins, 4) l'extravasation c'est-à-dire le passage de la voie sanguine vers le tissu secondaire et 5) la croissance de la métastase dans le site secondaire et particulièrement le poumon, le foie, la moelle osseuse et le cerveau.

Les plaquettes sanguines ont pour rôle principal l'arrêt des saignements après blessure au niveau des vaisseaux sanguins, leur implication dans la dissémination métastatique a également été décrite. L'aspirine, un inhibiteur de cyclooxygénase -1 et -2 (COX-1 et -2), administré quotidiennement à faible dose, diminuerait la formation de métastase du cancer du côlon, chez des patients traités pour des pathologies cardiovasculaires. Des études in vitro montrent un impact de l'aspirine sur la croissance des cellules tumorales issues de cancer du côlon, alors que d'autres suggèrent que l'effet de l'aspirine sur la métastase passerait par les plaquettes. Cependant, à ce jour, il n'est pas clairement établi si l'effet anti-métastatique de l'aspirine passe par l'inhibition des plaquettes ou si l'aspirine agit via un autre mécanisme.

L'objectif de cette étude est donc de déterminer si l'effet anti-métastatique de l'aspirine passe par les plaquettes et/ou par un autre mécanisme. Pour cela nous utiliserons des animaux déficients pour la COX-1 dans l'ensemble de l'organisme et des animaux déficients pour la COX-1 uniquement dans les plaquettes sanguines. Nous traiterons également les animaux avec de l'aspirine quotidiennement. Nous utiliserons 808 animaux (souris *mus musculus*) au maximum pour cette étude avec des approches in vivo.

Remplacer

Une meilleure compréhension des pathologies telles que le cancer et le développement des nouvelles thérapies nécessitent d'utiliser des animaux car ce phénomène implique des interactions complexes entre les différents organes, la circulation sanguine et le système immunitaire qui ne peuvent pas être modélisés in vitro.

Réduire

Le nombre d'animaux a été réduit au maximum tout en permettant une analyse statistique avec le t-test de Student lorsque deux groupes sont comparés ou bien un test ANOVA lorsque plusieurs groupes sont comparés. Les tests ex vivo seront réalisés sur trois échantillons de sang pour chaque groupe de souris et en triplicat. Les expériences in vivo seront dupliquées afin de consolider les résultats. Cette étude se fera de façon séquentielle. En effet, les résultats seront analysés et la poursuite de l'étude sera évaluée après chaque étape afin de limiter le nombre d'animaux et si les résultats ne se révèlent pas convainquants. La première expérience qui sera réalisée et qui permettra de mettre en évidence le potentiel rôle anti-métastatique de l'aspirine, demande au minimum 24 animaux. Si cette première expérience ne nous permet pas d'établir un rôle anti-métastatique de l'aspirine ou de la COX-1 plaquettaire, l'étude ne sera pas poursuivie.

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'information. Les conditions du travail seront raffinées grâce aux précédentes analyses qui nous ont permis de diminuer le nombre de cellules injectées et la durée de l'expérience. Afin de limiter l'angoisse, l'inconfort, le stress et la douleur associés aux procédures expérimentales, une attention particulière est portée aux animaux tout au long de leur vie, avec un suivi régulier, un enrichissement du milieu après chaque intervention. Pendant les procédures, les conditions d'hébergement sont adaptées à l'état des animaux et les soins opportuns sont appliqués. De plus la voie d'administration du traitement sera évaluée lors de la première expérimentation (par voie orale dans l'eau de boisson ou par gavage). Si les premiers résultats obtenus avec l'eau de boisson sont convainquants, il ne sera pas nécessaire d'utiliser le gavage, méthode plus invasive et ainsi de raffiner les procédures.

10222 - Contexte scientifique -

La vision est une entrée sensorielle majeure pour guider nos actions et notre perception. Cependant, comprendre le traitement neuronal sous-tendant ces fonctions reste un défi majeur. Imaginons, par exemple, de devoir suivre du regard un objet en mouvement qui passe derrière un objet plus large, le tout dans un environnement pluvieux. Une telle tâche, apparemment réalisée sans difficulté, nécessite une ségrégation des divers signaux de mouvement. Pour résoudre ce problème, notre système visuel doit combiner les signaux sensoriels avec des connaissances a priori, et ce, à plusieurs échelles spatiales et temporelles. Depuis 50 ans, les neurosciences en vision ont accumulé un grand nombre de connaissances mais principalement sur la base d'étude de neurones individuels à une échelle restreinte. Or il apparaît clair que les traitements opérés par le système visuel sont distribués et en interaction constante au sein d'une même aire et entre plusieurs aires corticales.

- Objectifs du projet -

L'objectif du projet de recherche présenté dans cette saisine est de mieux comprendre les opérations neuronales qui relèvent ces défis à l'échelle mésoscopique (entre le microscopique, le neurone, et le macroscopique, le cerveau en entier). Pour ce faire, nous utilisons le modèle primate non-humain (PNH) éveillé ou anesthésié, qui se rapproche le plus de la vision chez l'homme. Sur ce modèle, nous enregistrons l'activité neuronale dans différentes aires du cortex visuel au niveau de l'activité de population neuronale avec une grande résolution spatiale, temporelle sur une large surface corticale. Les techniques utilisées seront l'imagerie optique à champ large, les matrices d'électrodes et la microscopie multi-photons. L'accès à ces données va nous offrir l'opportunité de mieux comprendre comment l'information visuelle est intégrée, représentée au niveau de la population neuronale et modulée pour sous-tendre la construction des perceptions.

- Bénéfice potentiel pour la société -

La réalisation de ce projet va nous permettre de comprendre comment le cerveau intègre et représente l'information visuelle. Le premier apport pour la société est donc un apport de

connaissance fondamentale. Le second est pour l'aide au développement de prothèses rétiniennes. Effectivement, nos connaissances fondamentales sur les capacités représentationnelles du système visuel sont utilisées pour aider au développement de la vision artificielle prothétique. Nous avons déjà contribué dans cette direction et avons démontré l'intérêt de l'utilisation d'un modèle animal maîtrisé pour tester et améliorer les prothèses rétiniennes.

- Description du projet et règle des 3R –

REMPACER

Pour ce projet, nous travaillerons pendant 5 ans sur le PNH. Le choix de l'espèce est dicté par la thématique de notre projet. En effet, aucune autre espèce n'a un système visuel suffisamment proche de l'humain, notamment avec une hiérarchie des aires corticales identiques, une vision diurne, une vision des couleurs trichromatique ainsi qu'une sensibilité psychophysique identique. Afin de minimiser le recours aux animaux, nous travaillons sur l'amélioration des techniques d'enregistrement ainsi que sur les méthodes computationnelles permettant de perfectionner le traitement des données et d'extraire le maximum d'information pour chaque animal utilisé.

REDUIRE

Dans ce projet, nous développerons en parallèle différentes approches pour optimiser la collecte de données par rapport au nombre d'animaux utilisés :

Le modèle classiquement utilisé au laboratoire est le macaque rhésus sur lequel nous poursuivons nos projets.

1) Macaque rhésus éveillé, dans une tâche de fixation. Sur ces animaux nous enregistrerons l'activité cérébrale par imagerie optique et/ou matrice d'électrode chroniquement implantée.

2) Dans le cas où nos explorations fonctionnelles nécessitent plus d'essais avec un meilleur signal-sur-bruit, nous travaillerons sur une préparation macaque rhésus anesthésié en semi-chronique.

En parallèle, nous désirons développer le travail le marmouset. Le marmouset nous permettra de travailler sur une espèce PNH qui possède 3 avantages significatifs pour notre projet : (i) un système visuel et un comportement restant proche de celui de l'homme ; (ii). L'animal est lissencéphale, ce qui va nous permettre d'étudier l'ensemble du système visuel (de V1 à V5), contrairement au rhésus; (3) c'est une espèce qui se reproduit rapidement et pour laquelle des outils génétiques sont déjà accessibles (Brain/MINDS project Japon).

3) En situation anesthésiée, nous pourrons imager le cortex en microscopie biphoton et mesurer les dynamiques d'activité corticale en parallèle dans 5 aires visuelles corticales (de V1 à V5).

4) Nous envisageons de travailler sur le marmouset éveillé, ce qui nous permettrait de diminuer le nombre d'animaux (de nombreuses acquisitions de données chez le même animal).

Le nombre d'animaux dont nous aurons besoin n'est pas le même en fonction (i) de l'animal (macaque vs marmouset) et (ii) et de l'état de veille (éveillé vs anesthésié). Voir Tableau 1.

En situation éveillée (1 et 4), nous estimons le besoin à 6 macaques et 12 marmousets, car nous avons besoin de 2(4) macaque (marmouset) par publication et que les données nécessaires à la publication d'un article se collectent au mieux en 1 an, à cela il faut rajouter le temps de travail pour publier, d'au moins 6 mois. Nous avons donc compté 2 macaques x 3 et 4 marmouset x 3).

En situation anesthésiée (2 et 3), 3 rhésus et 6 marmousets sont nécessaire pour publier. Nous avons donc estimé avoir besoin de 9 macaques et 18 marmousets (3x3 et 6x3).

Nous combinerons plusieurs questions scientifiques par animal et ainsi réduire le nombre d'animaux nécessaires.

RAFFINER

Dans l'ensemble de ces approches, la prémédication, anesthésie, analgésie, suivi et soins post-opératoires se feront systématiquement sous contrôle d'un vétérinaire ou un ingénieur d'étude en expérimentation animale. A noter que les méthodes d'imagerie photonique ont l'avantage d'être moins invasifs que l'électrophysiologie classique car ne pénétrant pas dans le cerveau. Dans la configuration (1), nous devons implanter un plot de tête, mais nous travaillons à raffiner cette partie pour remplacer le plot de tête par un masque.

10223 L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est une maladie vasculaire pulmonaire rare et grave, caractérisée par l'augmentation des résistances artérielles pulmonaires, aboutissant à une insuffisance cardiaque droite. Cette maladie peut survenir de façon sporadique (HTAP

idiopathique), dans un contexte familial (HTAP familiale) ou compliquer l'évolution de certaines pathologies (connectivite, cardiopathie congénitale avec shunt, hypertension portale, infection par le VIH) ou être associée à certaines situations particulières (ex : prise d'anorexigènes).

Si L'HTAP reste une maladie relativement rare, sa prévalence minimale en France étant estimée à 15 cas sur 1 million d'adultes, elle est mortelle à très courte échéance (2,8 ans) si elle n'est pas diagnostiquée et traitée. Les symptômes initiaux de l'HTAP, tels que dyspnée à l'effort, lipothymie et asthénie, peuvent être légers et peu spécifiques. En identifiant et en traitant les patients le plus tôt possible, il est possible de retarder la progression de l'HTAP.

Les options thérapeutiques ont progressé de manière considérable ces dix dernières années : Trois principales voies métaboliques sont impliquées dans la physiopathologie de l'HTAP et constituent les cibles des traitements spécifiques : la voie de l'endothéline, la voie du monoxyde d'azote et la voie de la prostacycline. En parallèle, la recherche de médicaments ciblant de nouveaux mécanismes physiopathologiques représente un enjeu majeur pour les années à venir. Les tests de nouvelles molécules doivent se réaliser sur des modèles animaux prédictifs de la maladie, afin d'optimiser la sélection des candidats médicaments qui entreront en phase clinique.

Nous disposons des 2 principaux modèles d'HTAP chez le rongeur induit par injection de monocrotaline ou par hypoxie chronique, mais ces 2 modèles ne miment pas exactement les remodelages vasculaires et les lésions plexiformes caractéristiques de l'HTAP chez l'homme. Ces modèles précliniques ont reçu l'accord de notre comité d'éthique et du ministère de la recherche en 2015 et nous souhaitons proposer un modèle plus prédictif. C'est la raison pour laquelle nous avons mis au point un nouveau modèle d'HTAP chez le rat ou la souris induit par l'administration conjointe de SUGEN (anticancéreux, inhibiteur de tyrosine kinase) associée à une hypoxie chronique suite aux premiers articles publiés dans la littérature. Ce modèle d'HTAP développé chez le rongeur, représente le modèle préclinique qui reproduit l'ensemble des caractéristiques physiopathologiques décrit chez l'homme. L'objectif de ces études consiste donc à évaluer, chez le rongeur, l'efficacité de nouveaux candidats médicaments sur ce nouveau modèle d'HTAP (très proche de la pathologie humaine) chez le rat ou la souris.

Les animaux reçoivent une ou plusieurs administrations sous cutanées de SUGEN (une seule chez le rat trois administrations chez la souris) et sont soumis à une hypoxie chronique de 3 semaines suivie ou non d'une période de normoxie de 3 semaines selon si le modèle est réalisé chez le rat ou la souris. En effet, les rats étant plus sensibles que les souris au développement de l'HTAP par le SUGEN et l'hypoxie, une période de normoxie de 3 semaines permet une installation plus marquée de la pathologie alors que chez la souris, l'hypoxie est maintenue sur plusieurs semaines. L'efficacité de composés candidats, administré de façon chronique, peut alors être évaluée, comme en clinique, de façon curative, une fois la pathologie installée. De façon intéressante, l'efficacité d'un traitement peut être évaluée tout au long du protocole à l'aide de plusieurs mesures échocardiographiques, et/ou en fin de protocole par mesure des pression systémique et ventriculaire droite et évaluation du niveau d'hypertrophie du ventricule droit. Tous ces examens de suivi sont réalisés sous anesthésie gazeuse avec l'animal placé sur un tapis chauffant permettant un réveil rapide pour les échocardiographies et un stress moindre. Un suivi clinique quotidien est assuré au sein même des cages d'hébergement, enrichies de petits bouts de bois ou de bout de cotons, pour anticiper toute douleur ou inconfort des animaux tout au long du projet. Une étude histologique réalisée sur les artères pulmonaires de petits calibres (<100µm) peut également venir compléter l'étude de l'efficacité d'un candidat médicament sur le remodelage vasculaire. Les données obtenues pour chaque paramètre peuvent être comparées aux données obtenues sur des animaux ayant reçu un traitement de référence et permettre ainsi l'évaluation précise de l'efficacité de nouveaux candidats médicaments.

Ces nouveaux modèles d'HTAP réalisés chez le rat et la souris comptent parmi les modèles les plus classiquement utilisés et sont validés par des plusieurs molécules de référence comme les antagonistes des récepteurs à l'endothéline et les inhibiteurs de la phosphodiesterase de type 5.

En raison des tests d'efficacité in vivo évalués, ces manipulations ne peuvent se réaliser que chez le rongeur dont la pathologie est induite avec l'association de certains agents (SUGEN+ condition hypoxie).

Nos données préalables réalisées avec des traitements de référence utilisés en clinique nous ont également permis un calcul de la taille des cohortes d'animaux nécessaires aux tests d'efficacité d'une molécule candidate, permettant ainsi de limiter le nombre d'animaux utilisés sans pour autant diminuer la puissance de nos analyses. Enfin, un certain nombre de mesures a été mis en place afin d'éviter toute souffrance et respecter le bien-être des animaux. Pour tester l'efficacité d'un candidat médicament sur une série expérimentale, incluant un groupe sain (contrôle négatif), un groupe HTAP traités avec le véhicule (contrôle positif), 3 groupes tests (1 composé candidat testé à 3 doses), et un groupe incluant un composé de référence, le nombre total d'animaux pour une série expérimentale est de : 60 animaux ; pour un total de 15 séries sur 5 ans, soit 900 animaux.

10224 Objectifs du projet :

La finalité de ce projet de recherche transversale est de déterminer si et comment la glycosylation du fragment Fc des immunoglobulines (Ig) modifie leur pathogénicité dans des modèles animaux de Sclérose En Plaques (SEP).

Les anticorps (Ac) sont des médiateurs pathogéniques dans différentes maladies autoimmunes touchant le système nerveux central (SNC). Leur pathogénicité est médiée par leur fragment cristallisable (Fc), un domaine interagissant avec des récepteurs au fragment Fc (FcRs) et le complément. Récemment, l'identification de DC-SIGN et CD23 a permis la mise en évidence d'une nouvelle classe de FcRs, les FcRs de type II. Ces récepteurs de la famille des lectines se lient au domaine Fc des Ac lorsque celui-ci présente une conformation "fermée". La résultante de cette interaction a sans doute un intérêt certain puisque DC-SIGN et CD23 sont exprimés par des phagocytes capables de réduire voire même d'inhiber une réponse immunitaire installée.

La conformation adoptée par le domaine Fc est influencée par la glycosylation de l'asparagine en position 297 du Fc (Asn297). Ainsi, l'affinité du domaine Fc pour les différents FcRs est déterminée non seulement par l'isotype de l'Ig mais aussi par la N-glycosylation du Fc. Au cours de ce projet, nous allons étudier la conséquence pathologique de la glycosylation du Fc in vivo en utilisant un Ac monoclonal (mAb) démyélinisant (IgG1) qui sera produit sous différentes glycoformes. Cette étude nous apportera un éclairage sans précédent sur l'impact fonctionnel de la glycosylation sur la réponse humorale dirigée contre la myéline.

Nombre et type d'animaux utilisés :

7104 souris seront nécessaires pour mener à bien ce projet, divisé en 11 procédures expérimentales. Ce nombre d'animaux nous permettra de répondre aux objectifs scientifiques du projet et une interprétation sans ambiguïté des résultats.

-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 dysrégulation 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 interindividuelle 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.

10225 L'hyperplasie congénitale des surrénales est une maladie due à un dysfonctionnement des glandes surrénales, situées au-dessus des reins et qui servent à produire plusieurs hormones essentielles. Héréditaire, la maladie est due à des mutations du gène CYP21 qui créent un déficit de l'enzyme surrénalienne 21-hydroxylase (21-OH). Sa fréquence est d'environ 1 cas pour 14000 naissances. Les mutations du gène CYP21 bloquent la synthèse de deux hormones, le cortisol et l'aldostérone. L'hypocortisolémie induite par les mutations stimule l'hypophyse qui pour compenser, fait grossir les surrénales (« hyperplasie »). Mais au lieu de produire cortisol et aldostérone, les surrénales produisent des quantités importantes d'androgènes, qui entraînent une virilisation chronique des personnes de sexe féminin.

Dans les pays développés, la maladie est dépistée systématiquement chez les nouveau-nés. En effet, depuis les années 1950, il existe un traitement qui, démarré précocement, permet de limiter les signes de virilisation et le risque vital qui existe dans certaines formes de la maladie. Il consiste à administrer des hormones de substitution à vie. Ce traitement a de nombreux effets indésirables (obésité, ostéoporose, freinage de la croissance) et n'évite que très imparfaitement la virilisation des organes génitaux, l'hyperpilosité et la masculinisation de la silhouette. Dans les formes sévères de la maladie, des interventions chirurgicales répétées sont nécessaires pour corriger la virilisation du clitoris. Le développement de nouvelles thérapeutiques est donc essentiel.

L'objectif de notre projet préclinique est de réunir les données permettant d'envisager de compenser la déficience du gène CYP21A2 muté par l'import dans le cortex surrénalien d'un transgène, le gène CYP21 humain normal après en avoir optimisé la séquence. Le véhicule employé pour importer ce gène dans les surrénales est le vecteur composé par une capsid virale AAV (Virus Adeno-Associé) contenant une construction plasmidique portant le gène humain normal CYP21A2 dans une version optimisée pour la thérapie génique. Un AAV avec une séquence macaque fascicularis sera aussi testé comme comparateur pour la tolérance immunitaire de la protéine humaine par le primate.

Des études récentes nous ont permis de sélectionner trois constructions d'AAV que nous nous apprêtons à tester.

Le design expérimental inclut 22 macaques fascicularis femelles et séronégatives pour les 3 vecteurs administrés. Les animaux recevront sous anesthésie générale, une administration d'AAV par voie intraveineuse selon la répartition suivante : 3 groupes, 1 vecteur/groupe, 3 périodes de suivi (1.5, 3 et 6 mois) /groupe, 3 à 4 animaux/période de suivi.

Etant donnée la variation entre individus, ce nombre d'animaux est nécessaire afin d'effectuer des tests statistiques (Anova, tests non paramétriques type Wilcoxon- Mann-Whitney et Kruskal-Wallis). Trois périodes de temps de suivi sont nécessaires pour vérifier que le contenu cellulaire en vecteur ne décline pas au fil du temps : les cellules du cortex surrénalien sont en effet régulièrement renouvelées par mitoses/différenciation à partir de progéniteurs de la capsule de la surrénale (« turn-over centripétal »), normalement assez lent chez des singes de cet âge. L'étude à 3 et 6 mois permet de s'assurer que le contenu en vecteur ne diminue pas significativement par rapport à l'étude à 1.5 mois.

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 de suivre différents paramètres (biochimiques, hématologique, immunologiques...).

Au terme des 3 périodes de suivi, les 22 primates seront euthanasiés pour les prélèvements post mortem afin d'évaluer leur bio distribution.

Réduction :

La constitution des groupes (3-4 animaux/période de suivi/groupe) est basée sur notre expérience et le type d'analyses réalisées, et permettra d'obtenir des données statistiquement significatives permettant d'évaluer l'effet thérapeutique du traitement et sa toxicité potentielle. Cela semble être un nombre minimal pour assurer la robustesse des résultats.

Raffinement :

Des protocoles anesthésiques et d'analgésie adaptés seront mis en place selon la procédure. L'administration expérimentale (injection intraveineuse) se déroulera sous anesthésie générale (anesthésie fixe avec relai gazeux). Les prélèvements sanguins seront effectués sous protocole d'anesthésie de courte durée (environ 10 min). Des critères de points limites sont prévus pour prendre en compte des effets inattendus engendrant une souffrance de l'animal pour laquelle les traitements classiques n'auraient pas d'effet. Dans ce cas, le vétérinaire, présent quotidiennement sur site, sera alerté et mettra en œuvre des traitements appropriés ou décidera d'une euthanasie. Les animaux seront nés en captivité et proviendront d'élevages agréés. L'état général et l'alimentation seront surveillés quotidiennement. Ils seront hébergés en groupe pour favoriser les interactions sociales. Le Centre de thérapie génique dispose d'un programme d'enrichissement pour les macaques : distribution de jouets, de fruits frais et secs cachés dans la litière ou en hauteur, visionnage de films, aménagement de l'habitat (volières).

Remplacement :

Les études chez le PNH apportent les meilleures connaissances transposables à l'homme en termes d'efficacité et de toxicité. De plus, il n'est pas possible de tester *in vitro* ou *in silico* l'efficacité thérapeutique d'une telle thérapie car sa validation requiert de corriger un système de régulation à l'échelle d'un organisme vivant, dont les fonctions endocriniennes font interagir surrénales et hypophyse (boucle homéostatique finement réglée).

10226 Les troubles de l'audition et de l'équilibre constituent un problème de santé croissant et un besoin médical non satisfait. En France, les pertes d'audition touchent plus de 10% de la population adulte, tandis que le vertige constitue le troisième motif de consultation chez le médecin généraliste et représente 5% des urgences hospitalières. Les pathologies auditives et vestibulaires constituent donc un lourd fardeau pour notre système de santé. Des déafférentations cochléaires ou vestibulaires aiguës pourraient supporter une majorité des atteintes auditives et vestibulaires, telles que les altérations auditives dues au bruit et les surdités brusques, les labyrinthites, névrites vestibulaires, vertiges d'origine ischémique et maladie de Ménière. Il n'existe actuellement aucun traitement pharmacologique ciblé pour réparer efficacement les synapses primaires de l'oreille interne en conditions pathologiques. Cependant, un processus endogène de réparation post-lésionnelle des synapses de l'oreille interne existe chez les mammifères. Ce processus permet, sous certaines conditions de restaurer l'audition et l'équilibre. Le présent projet entend explorer les processus de réparation des synapses primaires de l'oreille interne, déterminer leurs différentes phases et identifier les voies cellulaires et les effecteurs impliqués. Plusieurs études de transcriptome réalisées sur des neurones sensoriels déafférentés ou lésés ont révélé des changements dans l'expression de plusieurs gènes, démontré plus tard comme directement impliqués dans la croissance neuritique post-lésionnelle ou dans la réparation synaptique. Dans la présente étude, nous nous proposons de tirer parti de ces différentes études transcriptomiques pour évaluer l'implication des voies et d'effecteurs cellulaires dans le processus de réparation synaptique endogène qui se produit dans l'oreille interne du mammifère adulte après désafférentation. En retour, nous ambitionnons de trouver des approches pharmacologiques spécifiques pour stimuler les processus de réparation synaptiques et optimiser la restauration fonctionnelle de l'audition et de l'équilibre. Dans ce but, nous proposons de développer des modèles *in vivo* de déafférentation sélective et réversible des organes de l'oreille interne. Ces déafférentations seront effectuées, par injection transtympanique unilatérale d'agonistes des récepteurs au glutamate. Ce modèle sera utilisé afin d'évaluer la modulation réactionnelle de l'expression de gènes candidats, et pour tester les bénéfices fonctionnels de la modulation pharmacologique des voies et effecteurs sélectionnés. Un modèle de co-cultures de neurones ganglionnaires et de cellules sensorielles cochléaire et vestibulaire sera également développé. Le présent projet est un prérequis à l'élaboration d'approches pharmacologiques pour optimiser et contrôler les mécanismes de réparation synaptique dans l'oreille interne, avec l'ambition d'impacter de manière significative sur la prise en charge clinique de ces pathologies. Ce projet nécessitera 480 souris sur une durée de 5 ans. Les tests de comportement vestibulaire et d'audiométrie seront réalisés sur les mêmes animaux qui seront ensuite utilisés pour des analyses histologiques, ce qui permet de réduire significativement le nombre de souris. Des traitements antibiotiques, anti-inflammatoires et analgésiques seront

administrés en post-opératoire. L'évaluation de la douleur et des déficits postopératoires chez les animaux lésés sera effectuée par surveillance des altérations du comportement, de la locomotion et des signes neurologiques, ainsi que de changements de l'apparence générale (texture pelage) et du poids. Il n'est malheureusement pas possible de remplacer le modèle *in vitro* sur certaines procédures car nous ne pouvons pas multiplier ces neurones en culture. Le projet sera réalisé grâce à une collaboration entre notre laboratoire et une entreprise de biotechnologie.

10227 L'obésité et surpoids confondus touchent près de la moitié des français. Cette pathologie est due à un déséquilibre de la balance énergétique correspondant à des apports alimentaires excessifs associés à une faible dépense énergétique. Il en résulte une prise de masse grasse importante ainsi que des complications physiopathologiques tel que le diabète de type 2 (DT2), à l'origine de conséquences cardiovasculaires et respiratoires. La prise masse grasse est influencée par de nombreux facteurs comme la prédisposition génétique, l'environnement, le statut hormonal de l'individu, l'alimentation, le manque d'activité physique et la sédentarité, mais aussi, directement ou indirectement, par la composition du microbiote intestinal. Le microbiote intestinal constitue en effet un écosystème complexe dont la diminution de la richesse et une altération de la diversité microbienne peut-être une des causes de l'obésité. En amont des prises en charge médicamenteuses voire chirurgicales de l'obésité, la mise en place de conseils et mesures hygiéno-diététiques (alimentation adaptée et/ou une augmentation du niveau d'activité physique) est à privilégier. Dans la littérature, la prise en charge par l'activité physique est reconnue comme plus efficace qu'un régime hypocalorique seul pour améliorer l'équilibre glycémique et la composition corporelle. Parmi les différentes modalités pouvant être proposées, les entraînements de type HIIT pour « High Intensity Interval Training » sont à présent privilégiés pour diminuer significativement la masse grasse totale et abdominale. De plus, ils permettent également d'impacter le métabolisme glucido-lipidique.

Des études récentes menées sur un complément alimentaire composé de plusieurs extraits végétaux, ont montré des effets bénéfiques sur l'évolution de la composition corporelle en diminuant la prise de masse grasse et sur le métabolisme glucidique en améliorant la sensibilité à l'insuline et en réduisant l'hyperglycémie et l'hyperinsulinémie. Le complément semble également améliorer la diversité de la flore intestinale et limiter en partie les altérations induites par un régime High Fat – High Sucrose (HF-HS) sur le microbiote.

Indépendamment les uns des autres, ces facteurs (l'activité physique et le complément) ont déjà démontré un effet bénéfique sur la composition corporelle, le DT2 et le microbiote intestinal. Dans cette étude qui durera au total 28 semaines, 60 rats Wistar mâles âgés de 8 semaines hébergés en cage individuelle seront rendus obèses sur 16 semaines par un régime HF-HS, puis soumis, selon le lot, à la prise d'un complément alimentaire et/ou un exercice physique intense (HIIT) durant 12 semaines. Nous cherchons alors à juger des effets distincts ou associés du complément et du programme d'entraînement sur l'évolution de la composition corporelle, de l'équilibre glycémique ainsi que sur la composition du microbiote intestinal.

Le protocole proposé s'inscrit dans le respect de la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner) pour l'expérimentation animale. Afin de comprendre les mécanismes sous adaptatifs au complément et/ou l'entraînement, nous ne pouvons pas remplacer cette expérimentation animale par une expérimentation *in vitro*, *ex vivo* ou *in-silico*. Le nombre d'animaux par lot est toutefois limité au maximum (à partir d'un test de puissance en lien avec la littérature). Aucune procédure très douloureuse n'est prévue mais nous mettrons en œuvre des méthodes permettant de limiter au maximum toute éventuelle souffrance de nos animaux (mise en place des points limites, utilisation de cages adaptées, surveillance quotidienne des animaux afin de prendre rapidement des décisions de soins ou d'exclusion d'animaux en souffrance).

10228 La chimiothérapie permet de guérir un nombre croissant de cancers. Pourtant, en 2017, une grande partie de ces traitements ne sont pas encore « ciblés » sur la tumeur : ils empêchent la multiplication des cellules du cancer, ce qui est l'objectif désiré, mais aussi certaines cellules normales, dans la moelle osseuse notamment, là où sont fabriquées les cellules du sang. La chimiothérapie fait donc baisser transitoirement les globules rouges, les globules blancs et les plaquettes (désignés sous le

terme de lignées sanguines). Malheureusement, dans un certain nombre de cas rares, les traitements anti-cancéreux sont eux-mêmes à l'origine du développement, longtemps silencieux, de maladies cancéreuses de la moelle osseuse : leucémies aiguës et myélodysplasies dites secondaires, survenant des années après la guérison du premier cancer. Les mécanismes conduisant à la leucémie secondaire ne sont pas bien compris, même si l'on sait que la chimiothérapie, en éliminant les cellules normales de la moelle, favorise aussi l'expansion de cellules minoritaires qui portent des anomalies génétiques de résistance aux traitements anti-cancéreux. Notre projet a pour objectif d'étudier, chez la souris, les phases précoces du développement leucémique favorisé par la chimiothérapie. Une meilleure compréhension de ces phases précoces permettra de surveiller les patients porteurs de cancers traités par chimiothérapie et ainsi de prévenir la survenue d'un second cancer, souvent fatal, chez des patients souvent guéris d'une première maladie grave.

Pour étudier la production des trois lignées sanguines par la moelle et les dérèglements induits au cours du temps par la chimiothérapie, un animal ayant un système sanguin proche du nôtre et une durée de vie suffisante est nécessaire : la souris est le modèle de référence pour les études du fonctionnement normal et pathologique de la moelle osseuse. C'est chez la souris que des premiers résultats précliniques ont été obtenus pour reproduire la leucémie aiguë secondaire, notre maladie d'intérêt. Nous souhaitons développer ces premiers résultats en étudiant la quantité des cellules souches de la moelle, avant et après chimiothérapie. Les cellules souches sont une population rare, capable de fabriquer toutes les autres lignées, mais aussi de se maintenir tout au long de la vie. Notre hypothèse est que la chimiothérapie diminue le nombre de cellules souches et que cette diminution favorise à son tour le développement précoce de la leucémie.

Notre projet d'expérimentation chez la souris aura une durée de cinq ans et utilisera 624 animaux au total. Il comprendra l'injection, par voie intra-péritonéale, de différentes chimiothérapies, seules ou combinées. La santé des animaux sera surveillée très régulièrement, trois fois par semaine (poids, état général), ainsi que la quantité de cellules sanguines (par des prélèvements intraveineux réguliers). Les effets possibles de la chimiothérapie comprennent une diminution du poids et des altérations du comportement et du pelage de l'animal. Mais la surveillance, à l'aide d'échelles standardisées, permettra de réduire au minimum la souffrance animale : dès qu'un signe de souffrance débutant sera détecté, l'expérimentation sera arrêtée. A la fin de l'expérimentation, les organes sanguins (moelle osseuse et rate) seront étudiés au microscope.

Notre démarche expérimentale se conforme au principe des 3R. Remplacer : actuellement, l'étude de la production des lignées sanguines et l'observation de l'apparition de maladies du sang nécessitent l'utilisation d'animaux. En effet, ces phénomènes se développent durant des mois ou des années et il n'est pas encore possible de les reproduire au laboratoire. Néanmoins, les hypothèses et les paramètres choisis dans cette étude reposent sur de nombreuses observations cliniques chez des patients ayant reçu de la chimiothérapie pour le traitement de leur cancer. Réduire : pour réduire le nombre d'animaux testés, nous réaliserons nos prélèvements sanguins sur des animaux vivants et, lorsque cela est possible, sur le même animal. Raffiner : des protocoles d'intervention en cas de souffrance débutante seront mis en place (isolement de l'animal, réchauffement, enrichissement de l'alimentation et du milieu), ainsi que des critères stricts d'arrêt de l'expérimentation. Enfin, nous n'avons pas pour objectif de parvenir à reproduire intégralement la maladie humaine chez l'animal, mais nous chercherons à détecter l'apparition dans le sang d'anomalies génétiques qui précèdent la maladie, c'est-à-dire de marqueurs de substitution.

La capacité de la moelle osseuse à se réparer après chimiothérapie est un domaine encore peu étudié. Nous pensons que notre projet à son terme pourra apporter des avancées significatives et participer à l'amélioration du traitement du cancer.

10229 Les vitamines B9 et B12 sont de donneurs de méthyle, c'est à dire, qu'elles apportent un groupement méthyle, indispensable pour la synthèse et réparation de l'ADN mais également pour la synthèse des multiples protéines. Ces micronutriments sont obtenus principalement à partir de légumes à feuilles (B9) et à partir des aliments d'origine animale (B12). La carence nutritionnelle ou due à une maladie acquise ou génétique, peut avoir de conséquences graves sur la santé. Ces conséquences sont plus graves si la carence se produit dans des étapes précoces de la vie. Des

études précédentes sur des animaux présentant une déficience en donneurs de méthyle pendant la gestation et l'allaitement, ont montré un faible poids de naissance et une accumulation de graisses dans le foie et cœur.

Cependant, la carence nutritionnelle globale n'est pas suffisante pour étudier de manière précise les mécanismes impliqués dans chaque organe. C'est pourquoi, un modèle de souris, dont une protéine clé dans le métabolisme des donneurs de méthyle est supprimée, sera plus adapté pour connaître et comprendre les mécanismes impliqués dans la maladie. La protéine MMACHC joue un rôle central dans le métabolisme de la vitamine B12 et une mutation du gène MMACHC cause une maladie nommée « cblC » qui est la maladie génétique la plus commune du métabolisme intracellulaire de la vitamine B12. La cardiomyopathie dilatée prénatale peut présenter une manifestation de cblC. Jusqu'à présent, on sait peu de choses sur les mécanismes de la décompensation cardiaque provoquée par une mutation du gène MMACHC. Notre projet vise à étudier les mécanismes fonctionnels, moléculaires et tissulaires de la cardiomyopathie causés par une altération de l'activité de la protéine MMACHC dans des conditions de carence nutritionnelle pendant la période gestationnelle et périnatale, jusqu'au sevrage chez la souris mutante MMACHC hétérozygote.

1. Remplacement : Il n'y a pas d'approche alternative in vitro parce que notre étude se concentre sur les effets fonctionnels dans un organe.

2. Réduction : 64 animaux seront utilisés au cours de l'étude : 4 mâles reproducteurs, 12 femelles sauvages ou hétérozygotes soumises à un régime alimentaire spécifique, 48 souriceaux, répartis en 8 groupes de 6 individus afin d'assurer une interprétation scientifique des résultats par des tests statistiques appropriés. Les animaux surnuméraires seront préservés pour maintenir la lignée transgénique dans notre établissement utilisateur.

3. Raffinement : Les animaux sont surveillés quotidiennement, et la procédure d'estimation et d'élimination de la douleur est mise en place et doit être suivie. Le point limite est défini et le score d'évaluation du mal être animal est calculé selon des critères quantifiables (perte de poids, signes visibles, comportement, etc.) et validés par notre vétérinaire référent. Les procédures envisagées ne devraient pas engendrer de souffrance chez les animaux car elles sont basées sur des changements alimentaires pendant quelques semaines (carence en vitamines chez les femelles).

À la fin du protocole, les animaux seront euthanasiés et des échantillons seront prélevés (sang, cœur, cerveau, foie, graisse viscérale) pour permettre des analyses biochimiques et histologiques dans le but d'évaluer les changements métaboliques dans chaque organe.

10230 Les plaquettes sanguines sont les principaux acteurs de l'hémostase primaire, processus physiologique permettant l'arrêt des saignements. Elles sont de petite taille (2 μm de diamètre environ) et circulent sous forme discoïde. Cette morphologie est soutenue par un anneau de microtubules (MT) que l'on appelle bande marginale. Certaines pathologies s'accompagnant d'une perte de la forme discoïde sont liées à des anomalies de certains types de tubuline, les constituants des microtubules. Notre projet vise à étudier le rôle de certaines tubulines dans le mécanisme unique d'assemblage des MT dans la bande marginale des plaquettes et à terme d'améliorer le diagnostic et le traitement des patients présentant des maladies plaquettaires.

L'étude de patients et de souris inactivées ont montré que l'absence de tubuline beta1 perturbe la formation de la bande marginale. Plus récemment un modèle de souris mutées sur la tubuline alpha4A a également montré un défaut de formation de cette bande marginale. Ces résultats suggèrent que l'hétérodimère de tubuline alpha4Abeta1 est un élément essentiel dans la formation de cet anneau de microtubules lors de la biogenèse des plaquettes sanguines. Nous nous proposons d'étudier l'effet de l'absence combinée de ces deux isotopes de tubuline sur la production des plaquettes et sur leurs propriétés fonctionnelles. Les expériences consisteront dans un premier temps en la génération d'une souche de souris invalidées pour ces 2 tubulines, puis en des prélèvements de sang pour réaliser, des numérations plaquettaires, l'évaluation ex vivo de la biologie et de la morphologie des plaquettes et de leur réactivité. La capacité de ces souris mutées à stopper un saignement sera mesurée par le temps de saignement suite à une coupure au niveau de l'extrémité de la queue de l'animal. Nous serons attentifs à être en adéquation avec la règle des 3R.

Réduction. Une même souris sera utilisée pour plusieurs types d'expériences et comme nous maîtrisons l'ensemble des techniques mises en œuvre dans ce projet, aucune mise au point préalable n'est nécessaire. Le nombre d'animaux utilisés pour cette étude est calculé au plus près afin de permettre une analyse statistique des données (test de Student).

Remplacer. Les plaquettes étant des éléments anucléés, elles ne sont pas manipulables génétiquement. L'utilisation de souris est donc incontournable pour les isoler.

Raffinement. Pour chaque procédure, les animaux sont anesthésiés et un traitement approprié contre la douleur leur est administré. Les conditions d'environnement sont optimisées par l'enrichissement des cages avec du coton compressé et de la frisure de papier ce qui leur permet de compartimenter leur environnement selon leurs besoins. Les animaux entre 2 et 6 par cage, ont un accès permanent à l'eau de boisson et à la nourriture. Après une procédure, une attention particulière sera portée au réveil des animaux et l'enrichissement des cages sera augmenté afin d'être mieux adapté.

L'étude nécessitera 156 souris pour générer les doubles mutants et 112 souris pour l'étude soit 268 au total.

10231 Les bactéries de l'espèce *Haemophilus influenzae* sont des colonisatrices habituelles de la région nasopharyngée chez l'homme.

H. influenzae se divise en deux groupes dont l'un est responsable d'infections le plus souvent bénignes (otites, sinusites). De manière plus ponctuelle, ces bactéries peuvent également être associées à des pathologies plus graves, telles que la pneumonie. Enfin, elles ont parfois un rôle d'exacerbation dans les bronchites chroniques.

Récemment, il a été démontré que les infections de la zone nasopharyngée avaient une incidence sur le microbiote du tractus digestif. Dans ce projet, nous souhaitons explorer la piste inverse : peut-on prévenir ou amoindrir les effets d'une infection par *H. influenzae* en jouant sur le microbiote intestinal par l'administration de souches bactériennes potentiellement bénéfiques sur la santé (bactéries probiotiques).

Pour ce faire, nous utiliserons un modèle de souris infectées par 2 souches différentes de *H. influenzae*. Afin de réduire le nombre d'animaux nécessaires, des bactéries probiotiques seront choisies via un criblage *in vitro* effectué au préalable et seules les quatre meilleures souches seront testées *in vivo*. La complexité des phénomènes biologiques (interactions tripartites entre l'organisme hôte, un agent pathogène et les bactéries probiotiques) ne permet actuellement pas d'envisager de modèles purement *in vitro*, dont les résultats restent uniquement indicatifs. Une validation *in vivo* est nécessaire avant d'envisager des essais cliniques chez l'homme. Des essais préliminaires en effectifs réduits seront ensuite conduits afin de vérifier la réponse des animaux dans les conditions expérimentales envisagées. Six cent cinquante souris (650) seront utilisées afin de pouvoir tester quatre souches bactériennes potentiellement bénéfiques.

Pendant deux semaines, les animaux recevront par gavage à l'aide de mini-sondes adaptées aux souris, les bactéries probiotiques sélectionnées. Elles seront ensuite exposées aux bactéries pathogènes *H. influenzae*, qui occasionnent des symptômes légers qui disparaissent en temps normal en quelques jours. Cette exposition se fera sous anesthésie légère (environ 2h) par le dépôt d'une goutte de quelques microlitres de suspension bactérienne pathogène au niveau des narines. L'inhalation de cette goutte déclenchera ultérieurement les symptômes. Les souris seront euthanasiées au moment où les symptômes sont les plus nets afin de vérifier si les bactéries probiotiques testées ont pu exercer un effet bénéfique. Nous mesurerons, entre autres, la perte de poids occasionnée par la maladie, la charge bactérienne résiduelle dans les poumons, les modifications de microbiote intestinal et effectuerons une analyse de la réponse immunitaire. Au cours de ces essais, nous veillerons au bien-être des animaux en leur fournissant un hébergement adéquat : eau et nourriture à volonté, mise à disposition de matière nécessaire à la confection d'un nid, 4-5 animaux par cage (les souris sont des animaux sociaux). Pour limiter au maximum l'inconfort des animaux, nous avons également défini des critères d'arrêt de l'essai à l'avance.

Outre une amélioration des connaissances sur les interactions entre les poumons et les intestins, nous espérons pouvoir identifier une (ou plusieurs) bactérie(s) d'intérêt qui pourrai(en)t ensuite être

utilisée(s) pour réduire l'incidence et les inconforts générés par les pathologies associées à *Haemophilus influenzae*.

10232 La consommation de charcuteries est associée à une augmentation du risque de cancer du côlon. Les études expérimentales à l'aide de modèles animaux ont permis de déterminer les mécanismes impliqués : le fer sous forme hémique est proposé comme le principal responsable de cet effet promoteur. Cette promotion du risque de cancer colorectal par le fer hémique est expliquée par une forte oxydation des lipides et formation de composés toxiques avec les nitrites des charcuteries. De plus, il a été démontré que cette promotion pouvait être inhibée par l'enrichissement du régime en calcium ou D-alpha-tocophérol. Ce dernier résultat ouvre la possibilité de la prévention du risque par modification du produit mis sur le marché (en particulier par ajout de tocophérol pour limiter la formation des composés toxiques).

Dans ce cadre, il a été aussi proposé que l'enrichissement de la ration des animaux de rente (les porcs) pouvait être une porte d'entrée pour enrichir la viande en antioxydants afin de limiter le risque de cancer du côlon associé à la consommation de charcuteries (preuve de concept acquise avec tocophérol). En parallèle, il existe des "mixes" d'antioxydants végétaux commerciaux pour compléter la ration des animaux de rente.

Dans ce contexte, ce projet vise à évaluer si l'enrichissement de la ration des porcs avec un mixe d'antioxydants pourrait présenter des effets supérieurs au tocophérol après consommation de la charcuterie grâce à la complémentarité des antioxydants présents dans le mixe. Dans le cadre de ce projet, l'objet de la présente demande est de comparer dans un modèle animal classiquement utilisé pour étudier la relation aliment/cancer (48 rats Fisher F344 males de 5 semaines) l'effet d'un mixe d'antioxydants sur la modulation des biomarqueurs fécaux et urinaires associés à la promotion du cancer, lorsque ce mixe est utilisé pendant l'élevage dans la ration du porc.

Pour cela une expérimentation nutritionnelle chez le rat F344 de 15 jours avec suivi des biomarqueurs de J11 à J15 sera mise en place. Durant cette étude les fèces et urines seront récupérées de J11 à J15. Cette expérimentation sans prélèvement sur les animaux vivants (hors fèces et urine) sera conduite dans le respect de la règle des 3R : l'utilisation d'un modèle animal est indispensable car nous travaillons au niveau du côlon où le microbiote joue un rôle très important ; le nombre d'animaux est réduit au maximum pour toutefois maintenir une puissance statistique suffisante (ANOVA et test de Dunnett) ; les conditions expérimentales prennent en compte des mesures de raffinement (hébergement enrichi, surveillance, définition de points limites avec critères d'interruption précoces, soins zootechniques et vétérinaires appropriés.). Les rats sont logés à 2 par cage pour limiter le stress, sauf pendant les 5 jours de prélèvements fécaux et urinaires où les rats seront à 1 par cage transparente à métabolisme permettant ainsi le maintien du contact visuel et olfactif avec leurs congénères même lors de ce court passage en cage individuelle.

10233 Notre équipe s'intéresse aux rôles de la sérotonine (5-hydroxytryptamine, 5-HT) neurotransmetteur du système nerveux central. Nos études portent plus spécifiquement sur le rôle d'un des 15 récepteurs cibles de ce neurotransmetteur, le récepteur 5-HT_{2B}, dans le système nerveux central. En collaboration avec des généticiens, nous avons montré que ce récepteur lorsqu'il était muté chez l'homme, était associé à une impulsivité excessive. D'autres résultats non-publiés en collaboration avec des cliniciens indiquent que les individus ayant une expression faible du récepteur 5-HT_{2B} se retrouvent avec une fréquence plus élevée chez des cocaïnomanes.

Une partie des résultats expérimentaux de notre équipe provient de l'étude des déficits comportementaux chez la souris mutante 5-HT_{2B}^{-/-} où l'élimination du gène codant pour le récepteur 5-HT_{2B} a été obtenue par recombinaison homologe. Nos données publiées montrent que l'expression du récepteur 5-HT_{2B} est requise pour les réactions comportementales induites par les substances psychostimulantes dérivées d'amphétamine comme la MDMA (principe actif de l'Ecstasy), l'amphétamine, ou le coupe-faim dexfenfluramine mais aussi d'antidépresseurs type Prozac ou autres inhibiteurs sélectifs de la recapture de sérotonine (ISRS) ou de molécules pro-inflammatoires. D'autres données indiquent une régulation possible des cellules microgliales (macrophages résidents du cerveau) par la sérotonine. Nos données indiquent que ces cellules expriment majoritairement le récepteur de la sérotonine 5-HT_{2B}. Enfin, de manière

complémentaires aux observations chez l'homme, nos données récentes chez la souris indiquent que l'inactivation totale de ce récepteur favorise une impulsivité anormale ainsi que les comportements d'addiction à la cocaïne. Le but de nos travaux actuels est donc d'affiner nos données chez la souris afin de comprendre plus en détail les fonctions cérébrales contrôlées par ce récepteur et ainsi d'en comprendre les pathologies associées, impulsivité, addiction ou encore comportement psychotique en relation avec les processus inflammatoires.

Cependant, nos travaux publiés ont aussi montré que l'inactivation totale du gène du récepteur 5-HT2B (c'est à dire dans tous les types cellulaires) provoque des anomalies du développement cardiaque induisant une létalité embryonnaire partielle. Une technique permet de réduire l'impact de ces anomalies développementales délétères pour l'animal. Elle consiste en l'utilisation d'inactivation conditionnelle des gènes permettant de la limiter à un tissu précis où se fait cette inactivation. On peut ainsi étudier l'impact de la mutation du récepteur 5-HT2B dans les neurones à sérotonine, à dopamine, ou dans les microglies sans avoir d'effet cardiovasculaires délétères.

Nous prévoyons de valider les phénotypes observés après l'élimination de l'expression totale à ceux consécutifs à une invalidation conditionnelle (locale) du récepteur 5-HT2B. Nous nous focalisons sur certaines structures du cerveau, neurones à sérotonine des noyaux du raphé, neurones à dopamine de l'aire tegmentale ventrale/substance noire et cellules microgliales. Ces souris sont analysées dans une série de tests comportementaux afin d'évaluer les modifications comportementales éventuelles induites par l'ablation sélective des récepteurs 5-HT2B, en particulier leur réponse à certains composés pharmacologiques, à un stress de défaite sociale ou un stress de contrainte.

Notre approche de l'impact de l'absence d'un sous-type de récepteur de la sérotonine sur le fonctionnement du système nerveux central nécessite d'utiliser des animaux pour pouvoir tirer des conclusions comportementales. Le raffinement de la qualité de vie des animaux est obtenu en enrichissant les conditions d'hébergement des animaux (pièces de cartons permettant la réalisation de nid), en réduisant la durée d'expérimentation et en prévoyant des anesthésiques et analgésiques en cas d'intervention invasive. Le nombre d'animaux mis en jeu lors de nos expériences de tests comportementaux (1152) est réduit au strict minimum nécessaire à atteindre la puissance statistique requise. Afin de restreindre encore la quantité, les animaux sont utilisés pour une série de test lorsque l'impact d'un premier test n'intervient pas sur les tests subséquents. De plus, de manière à réduire encore le nombre d'animaux utilisés, leur remplacement par une approche cellulaire est toujours privilégié, culture primaire de neurones ou de microglies mais aussi cellules transfectées lorsque la question scientifique posée le permet.

10234 L'allaitement exclusif pendant 6 mois est recommandé par l'Organisation Mondiale de la Santé car l'allaitement est bénéfique pour la santé de l'enfant, et ces bénéfices perdurent jusqu'à l'âge adulte. Si le taux d'allaitement a augmenté en France au cours de ces 20 dernières années (60% en sortie de maternité, en 2014), il reste très inférieur à celui des pays d'Europe de Nord (95% en Norvège) et surtout, il chute très vite dans les premières semaines de lactation. Parmi les causes d'arrêt prématuré de l'allaitement il y a la crainte des mères de ne pas avoir suffisamment de lait pour nourrir correctement leur enfant.

Pour évaluer objectivement ces craintes et afin d'élaborer des stratégies d'augmentation de la production de lait maternel, nous avons développé une méthode peu invasive, applicable aux rongeurs, de mesure de la production de lait maternel (méthode à l'eau deutérée). Nous avons appliqué cette méthode sous régime restreint en protéines, dans un modèle de rats nés avec un retard de croissance intra-utérin. Dans ces conditions, le flux de lait de la mère aux petits est diminué de 34% par rapport à un régime contrôle normo-protéique.

Dans cette nouvelle saisine, nous allons tester si une supplémentation du régime de la mère avec des molécules « galactologues », pendant la gestation et/ou la lactation, permet d'augmenter le flux de lait de la mère aux petits. Les molécules testées sont 3 acides aminés et 3 extraits végétaux. Ces composés seront testés dans des conditions :

- de régime normo-protéique : cela correspond à la norme du régime alimentaire maternel pendant l'allaitement en France ;

- ou de régime restreint en protéines, dans un modèle de RCIU (7% des naissances en France).

La totalité des procédures ne devraient pas entraîner de souffrance pour les animaux. Les animaux feront l'objet d'une surveillance quotidienne y compris le week-end (procédure mise en place en Septembre 2013).

Nous respecterons la règle des 3 R :

1. Remplacement : Il s'agit d'une étude in vivo visant à évaluer des stratégies nutritionnelles sur la production de lait maternel. Il n'existe donc pas de modèle in vitro permettant le remplacement de l'étude animale.

2. Réduction : Le nombre d'animaux a été réduit au minimum. Le nombre de rates prévu est de 300 rates et prend en compte la nécessité d'avoir au moins 6 mères différentes par groupe expérimental pour des raisons de calcul statistique.

3. Raffinement : Pour les animaux, l'évaluation de la douleur sera faite à l'aide d'observations physiologiques (poids), comportementales (consommation de nourriture, fuite ou défense de l'animal à la manipulation, activité) et en fonction de l'apparence de l'animal (poil, posture). Aucune souffrance (ou très faible) n'est attendue lors des manipulations prévues. Les animaux seront observés tous les jours y compris le Week-end.

L'ensemble des procédures demande l'utilisation de 300 rates au maximum.

10235 Récemment, de nouveaux outils d'édition du génome ont rendu possible le développement de la plupart des modèles de souris dans d'autres espèces plus pertinentes. Nous développons des rats génétiquement modifiés pour des laboratoires académiques grâce à ces outils. Afin de répondre aux besoins de ces chercheurs, nous développons actuellement des modèles de rats CreErt2-LoxP qui permettent de déléter un gène d'intérêt de façon inductible à tout moment au cours du développement ou de la vie de l'animal grâce à un traitement au Tamoxifène. En effet, le Tamoxifène, un médicament déjà utilisé en clinique chez l'homme, va induire l'activation de la CreErt2 qui va pouvoir déléter la séquence ADN comprise entre 2 séquences ADN LoxP qui auront préalablement été insérées dans le génome des rats. De cette façon, le rôle de ce gène pourra être étudié à un moment précis de la vie de l'animal. Si le modèle le nécessite, la CreErt2 pourra être exprimée dans un tissu particulier afin que la délétion du gène soit tissu-spécifique.

Pour ce projet, un total de 360 animaux sera nécessaire.

Dans le respect de la règle des 3R, le nombre d'animaux a été réduit au maximum. Le bien-être animal étant crucial pour nous, le but est d'améliorer la condition de vie des animaux et d'éviter le stress, pour cela les cages sont enrichies de produits d'enrichissements : rouleau de carton, paper wool. Les animaux seront surveillés quotidiennement (incluant les week-ends). Au cours du projet, la douleur et l'état général des animaux seront évalués par des points limites (scoring). Si une souffrance est détectée un antalgique sera administré.

10236 Ce projet est un projet de recherche fondamentale ayant comme finalité l'identification des différentes populations de cellules souches mammaires ainsi que leur caractérisation et leur rôle dans le développement de la glande mammaire. Pour étudier les cellules souches mammaires chez la souris et identifier le rôle de gènes dans le développement du tissu sécréteur mammaire, la recherche utilise une méthode standard de transplantation de cellules mammaires qui permet de conserver le microenvironnement local, contrairement à des études fonctionnelles in vitro. Dans ce protocole expérimental, nous proposons d'appliquer cette technique à l'étude des cellules souches mammaires bovines en transplantant différentes populations de cellules souches bovines chez des souris. L'évaluation de la capacité des cellules mammaires à coloniser un tissu mammaire est réalisée en transplantant les cellules à étudier dans une glande mammaire de souris « Nude » dépourvue de ces cellules épithéliales mammaires. Les souris Nude présentent la caractéristique d'être immunodéficientes, ce qui permet d'éviter le rejet des cellules greffées. Des résultats préliminaires nous ont permis d'optimiser cette technique de greffe hétérologue.

Différentes populations de cellules souches mammaires bovines seront transplantées selon le protocole défini lors des essais préliminaires. Ensuite, les capacités à se développer des populations de cellules souches bovines, seront étudiées durant la vie de l'animal y compris lors de cycle de gestation/lactation. Dans toutes ces expériences, le développement mammaire sera analysé.

Nous utiliserons 140 souris pour l'ensemble de ces expérimentations. Nous transplanterons les cellules dans les deux glandes mammaires inguinales (à gauche et à droite), ceci permet de diviser par deux le nombre d'animaux utilisé.

Lors des opérations, les animaux seront anesthésiés après avoir reçu un antalgique qui agira pendant et après l'opération. Après l'opération, le bien-être des animaux sera évalué grâce à une grille de cotation de la douleur. Si les animaux présentent des signes de douleur, des injections d'antalgiques seront réalisées. Si la douleur persiste les animaux seront euthanasiés. Tous les animaux utilisés pour cette expérimentation proviennent d'élevages reconnus et sont nés en captivité. Aucune alternative à nos procédures expérimentales, tel que l'utilisation de culture cellulaire, n'est possible puisque nous étudions la transformation de cellules dans un organe complexe composé de plusieurs types cellulaires. Le nombre d'individus a été réduit au maximum tout en générant un nombre de données suffisantes permettant des analyses statistiques fiables. Dans un souci de raffinement, les souris seront hébergées à plusieurs par cage, afin d'éviter le stress dû à l'isolement.

10237 L'étude décrite dans le présent dossier sera réalisée dans le cadre du développement d'un composé X, de type probiotiques, destinés à l'amélioration des troubles métaboliques, notamment l'obésité. L'objectif de la présente étude sera d'évaluer l'impact de ce composé sur la prise alimentaire, le poids corporel et la régulation glycémique chez des souris rendues obèses par un régime hyperlipidique (45% et 60% de graisses) pendant 12 semaines. Le traitement sera administré par voie orale pendant les 12 semaines de régime (T1 à T86).

Au cours du traitement, les paramètres suivants seront mesurés :

- le poids corporel sera mesuré 3 fois par semaine
- la prise alimentaire sera mesuré 1 fois par semaine
- la glycémie (après 4h de mise à jeun) sera mesurée toutes les 2 semaines
- les taux de triglycérides, de cholestérol total, de HDL et de LDL sera mesuré toutes les 2 semaines
- les taux d'Il-1beta, d'Il-6 et de TNFalpha seront mesurés toutes les 2 semaines
- un test de tolérance oral au glucose (OGTT) sera réalisé au dernier jour de traitement, et inclura 7 mesures de Glycémie et 3 mesures d'insuline
- la composition corporelle sera mesurée juste avant (T-1) et à la toute fin du traitement (T86).
- 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 (T87)

La présente étude nécessitera l'emploi de 48 souris C57Bl/6 réparties en 4 groupes expérimentaux :

- Groupe 1 : Souris nourries avec une alimentation contenant 45% d'énergie sous forme de graisses / Traitées au véhicule (n=12/ 6 mâles et 6 femelles)
- Groupe 2 : Souris nourries avec une alimentation contenant 45% d'énergie sous forme de graisses / Traitées au composé X (n=12/ 6 mâles et 6 femelles)
- Groupe 3 : Souris nourries avec une alimentation contenant 60% d'énergie sous forme de graisses / Traitées au véhicule (n=12/ 6 mâles et 6 femelles)
- Groupe 4 : Souris nourries avec une alimentation contenant 60% d'énergie sous forme de graisses / Traitées au composé X (n=12/ 6 mâles et 6 femelles)

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 souris/cage) et un enrichissement du milieu sera assuré par l'ajout d'igloos et de matériels de nidification.

Enfin, un suivi journalier des animaux à l'aide d'une grille de score permettra une action rapide en cas d'atteinte des points limites établis.

- Réduction : Le nombre d'animaux utilisés a été rationalisé à partir de l'expérience acquise par notre laboratoire sur l'analyse des paramètres d'intérêt. Ainsi, le nombre d'animaux par groupe a été adapté pour chaque série expérimentale en fonction des paramètres d'intérêt de façon à être

en mesure de mettre en évidence une différence statistiquement significative sur les paramètres étudiés.

- Remplacement : L'utilisation d'animaux à des fins scientifiques se justifie ici car il n'existe aucune méthode de substitution n'utilisant pas l'animal de laboratoire et permettant l'étude de l'impact d'un composé sur le poids corporel, la prise alimentaire et les troubles métaboliques.

10238 La cocaïne est la drogue qui crée la plus grande dépendance psychologique. Elle est la deuxième drogue illégale la plus consommée en Europe. Environ 20 % des usagers tombent dans l'addiction. En France, 1,5 million de personnes ont déjà consommé de la cocaïne au moins une fois. Parmi elles, 400.000 sont des consommateurs réguliers. En dépit des dangers de la cocaïne, le nombre de consommateurs continue d'augmenter de manière importante, notamment au cours de ces dernières décennies. Ils appartiennent à toutes les catégories d'âges, professions et couches sociales. D'autre part, le trafic de cocaïne occupe le deuxième rang des trafics de drogues illégales dans le monde. L'ensemble de ces données fait de la consommation de cocaïne un problème de société préoccupant. Il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement satisfaisant contre l'addiction à la cocaïne, au contraire d'autres drogues illégales comme l'héroïne. D'après le manuel de diagnostic et statistique des troubles mentaux (DSM-V), l'addiction peut se définir selon plusieurs critères : besoin de prendre la substance en quantité toujours plus importante, activité de recherche de la drogue au détriment de toute autre activité et prise de la drogue malgré ses conséquences négatives. Ces critères ont été modélisés chez le rat au moyen de tests comportementaux tels que respectivement : l'escalade de prise de drogue, le test de ratio progressif (PR) et le test d'association d'un choc électrique avec l'obtention de drogue. La stimulation à haute fréquence (SHF) du noyau subthalamique (NST) chez le rat diminue notamment la motivation à travailler pour la cocaïne dans le test de PR. Puisque l'enjeu du traitement de la dépendance à la cocaïne est de diminuer la motivation à prendre la drogue tout en maintenant/restaurant la motivation pour toute autre forme d'activité/récompense, la SHF du NST pourrait représenter une stratégie chirurgicale intéressante puisqu'elle diminue la motivation pour la drogue, tout en augmentant la motivation pour la nourriture. Cependant, avant de passer à l'application clinique, il nous semble essentiel de tester notre hypothèse chez un modèle de primate non-humain. L'objectif de notre projet est d'étudier les effets de la SHF du NST chez un singe travaillant dans le test de PR pour obtenir la cocaïne ou une récompense alimentaire, afin de comparer les résultats obtenus à ceux décrits chez le rat. Si nous pouvons reproduire les effets positifs de la SHF chez le primate non-humain, cette technique pourrait être proposée comme stratégie chirurgicale dans le traitement de l'addiction chez l'homme. Dans un deuxième temps, si notre hypothèse est confirmée, nous étudierons les mécanismes fonctionnels des effets de la SHF du NST grâce à l'utilisation de la tomographie par émission de positons (TEP), qui permet de visualiser l'activité dopaminergique in vivo et de manière peu invasive. En parallèle, nous étudierons l'influence des facteurs sociaux proximaux, avec ou sans SHF du NST, sur la prise de cocaïne et sur l'activité dopaminergique. Chez l'homme, on sait que la présence de pairs peut modifier la prise de drogue. C'est donc un facteur à considérer si l'on veut proposer une stratégie thérapeutique optimale. Enfin, nous testerons la spécificité de la SHF en réalisant les mêmes procédures lorsque le NST est stimulé à basse fréquence. Le projet sera réalisé chez 5 macaques rhésus. Les animaux seront leur propre contrôle afin de minimiser le nombre d'animaux utilisés. Le macaque rhésus est utilisé à la fois dans des protocoles d'auto-administration de cocaïne, et d'étude de l'influence de pairs et du métabolisme dopaminergique. Cela permettra donc de valider nos résultats en les comparant aux données de la littérature. Lors des procédures chirurgicales, un soin particulier sera apporté à l'analgésie péri-opératoire (morphiniques, anesthésie locale avant les incisions) et à l'utilisation d'anesthésiques les mieux adaptés aux procédures (durée, temps de récupération.). Ces protocoles seront discutés avec des anesthésistes-réanimateurs pour être optimisés. L'observation et le suivi pondéral quotidiens des animaux nous permettra d'interrompre les expériences en cas de signe de détresse (animal prostré, perte d'appétit et/ou de poids.) ou d'inconfort (stéréotypies, agressivité). Les animaux seront hébergés par paire ou en groupe dans un environnement enrichi (jeux, objets nouveaux, graines pour fourrager...). Dans notre projet, il s'agira de tester la motivation pour la cocaïne mais nous ne développons pas de protocole entraînant une dépendance à la cocaïne, afin d'éviter les

conséquences du sevrage sur le comportement. Cependant, une attention particulière sera apportée à l'observation du comportement de nos animaux avant, pendant et après les sessions d'auto-administration de cocaïne.

10239 L'inflammation correspond à la réponse biologique face à des stimuli nocifs tels que l'intrusion d'agents pathogènes externes (virus, bactéries, etc.) et internes (cellules cancéreuses) ou en réponse à l'endommagement des tissus (coupure, brûlures, etc.). L'inflammation repose sur l'intervention du système immunitaire, dans le but d'éliminer les agents pathogènes et les cellules lésées et de promouvoir la réparation des tissus endommagés. L'inflammation se déroule en deux phases : la première vise à éliminer la source de l'inflammation et les déchets. Elle dépend de la production de messagers chimiques pro-inflammatoires. Une fois la cause de l'agression éliminée, cette première phase doit être stoppée pour empêcher des dommages inutiles occasionnés aux tissus. Cette seconde phase dépend de la production de messagers anti-inflammatoires.

Lorsque cette seconde phase ne s'enclenche pas correctement, l'inflammation devient chronique. L'inflammation chronique est un facteur de risque majeur de plusieurs maladies telles que le diabète, l'obésité, ou l'arthrite rhumatoïde. Elle est également associée à l'épilepsie et à la majorité des maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson ou la sclérose en plaque.

L'objectif du projet est de comprendre quelles sont les fonctions d'une enzyme, la phosphatase alcaline non spécifique des tissus (en anglais, " Tissue Non-specific Alkaline Phosphatase ", sigle " TNAP "), dans le contrôle de l'inflammation.

Les phosphatases alcalines sont des enzymes localisées sur le versant extracellulaire des cellules. Elles sont responsables de la déphosphorylation d'un certain nombre de molécules phosphorylées extracellulaires. La TNAP, une des quatre iso-enzymes de la phosphatase alcaline, est exprimée dans un grand nombre de tissus (os, foie, rein, cerveau, sang, etc.).

Le rôle de la TNAP a été bien défini dans le tissu osseux où elle hydrolyse le pyrophosphate, un inhibiteur de la minéralisation. De fait, chez l'homme, une déficience en TNAP conduit à une maladie appelée " hypophosphatasie ", une maladie rare caractérisée par des déficits de minéralisation osseuse.

Deux autres fonctions de la TNAP doivent être mentionnées dans le contexte du contrôle de l'inflammation : 1) Déphosphorylation de la forme active de la vitamine B6, qui est nécessaire au bon fonctionnement d'une soixantaine d'enzymes. Deux de ces enzymes jouent un rôle dans le contrôle de l'inflammation via la production d'un produit anti-inflammatoire, l'hydrogène sulfuré. 2) Déphosphorylation des nucléotides de l'adénine : adenosine triphosphate (ATP), adenosine diphosphate (ADP) et adenosine monophosphate (AMP). Le produit final de ces déphosphorylations est l'adénosine. L'ATP et l'adénosine sont deux acteurs primordiaux des processus inflammatoires. L'ATP extracellulaire est une molécule pro-inflammatoire. À l'opposé, l'adénosine possède une action anti-inflammatoire.

Par ailleurs, des observations cliniques supportent le rôle possible de la TNAP dans le contrôle de l'inflammation : 1) Les jeunes patients hypophosphatasiques peuvent présenter une autoinflammation osseuse semblable à l'ostéomyélite multifocale chronique. 2) Le levamisole, un inhibiteur de la TNAP, peut provoquer de graves déficits au niveau du système immunitaire (leukopenia) ainsi que des lésions au niveau de la matière blanche du cerveau (leukoencéphalopathie multifocale inflammatoire) semblable à celles observées dans la sclérose en plaque. Le levamisole était utilisé comme adjuvant dans le traitement de certains cancers dans les années 1970-1990. La gravité des effets secondaires a conduit à abandonner son usage en clinique.

Les résultats au niveau biochimique et les observations cliniques suggèrent que la TNAP joue un rôle dans le contrôle de l'inflammation. Cependant, une relation de causalité reste à démontrer. Notre projet vise à établir ces liens de cause à effet en utilisant la souris comme modèle animal. Pour déterminer la contribution de la TNAP dans le contrôle de l'inflammation, nous utiliserons deux approches : 1) utilisation de souris chez lesquelles le gène de la TNAP a été inactivé ; 2) utilisation d'un inhibiteur spécifique de la TNAP (SBI-425). Deux modèles d'inflammation seront utilisés : 1) l'inflammation post-prandiale, consécutive à la prise de nourriture ; 2) une inflammation systémique

par injection d'agonistes aux récepteurs TLR (le plus connu étant le lipopolysaccharide, principal déclencheur de la réponse immunitaire induite par les bactéries pathogènes gram-négatives).

Dans un premier temps, une étude par imagerie (TEP, IRM) permettra d'examiner la distribution des marqueurs de l'inflammation et leurs modifications. Dans le cadre des 3 R (réduction), ces méthodes d'imagerie non invasives permettront de réutiliser ces souris pour la deuxième étape de l'étude : dans un deuxième temps, des prélèvements d'organes (cerveau, foie, os, muscle, rein, sang, cœur, aorte, poumons) seront réalisés après euthanasie des animaux. Dans le cadre des 3 R (réduction), ces organes seront divisés en trois lots pour réaliser des analyses reposant sur 3 niveaux différents dans 3 laboratoires différents :

1) Étude métabolomique : dosage des petites molécules (entre autres : ATP, adénosine) par RMN et par spectroscopie de masse.

2) Étude biochimique : dosage des marqueurs de l'inflammation (cytokines).

3) Étude histologique : changements induits par l'inflammation au niveau cellulaire (activité phosphatase alcaline, activation des cellules microgliales, etc).

Dans le cadre des 3R (raffinement), les souris seront hébergées dans des cages aux normes européennes où elles bénéficieront d'un milieu enrichi et seront manipulées par un personnel formé. D'autre part, les manipulations d'imageries seront réalisées sous anesthésie (isoflurane, un anesthésique couramment utilisé chez l'homme) et les paramètres physiologiques seront surveillés tout le temps de l'observation.

En parallèle, nous procéderons à une étude électrophysiologique davantage centrée sur le système nerveux : rôle de la TNAP dans le contrôle de l'inflammation induite par l'épilepsie. Dans le cadre des 3 R (remplacement), ces manipulations seront réalisées sur tranche de cerveau in vitro. Nous profiterons de cette étude pour tester des prototypes de microélectrodes et de biosenseurs, en cours de développement dans des laboratoires partenaires.

Le nombre d'animaux estimé pour notre projet est d'environ 380 souris.

10240 La croissance des tumeurs est très souvent dépendante du processus angiogénique, c'est-à-dire de la prolifération de vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants. Les néovaisseaux permettent un apport accru en oxygène et en nutriments dont les cellules cancéreuses ont besoin pour survivre et se multiplier. L'angiogenèse est donc essentiellement perçue comme un facteur de mauvais pronostic. Cependant, il a été montré récemment que tous les vaisseaux sanguins ne sont pas équivalents et que certains vaisseaux très spécifiques et impliqués dans le recrutement des lymphocytes, les vaisseaux HEV (High endothelial venule), seraient corrélés à un meilleur pronostic. Ainsi, dans les tumeurs du sein, une grande densité de vaisseaux HEV est associée à une survie plus longue des patientes. Ces vaisseaux HEV semblent participer à la réponse immune anti-tumorale en favorisant l'accès aux tumeurs des lymphocytes 'tueurs', capables de détruire les cellules cancéreuses.

Un objectif majeur du présent projet est de mieux comprendre l'origine des vaisseaux HEV et leur rôle dans les tumeurs afin de pouvoir agir sur ces vaisseaux dans le cadre de nouvelles stratégies de thérapie anti-cancéreuse. Récemment, certains mécanismes contrôlant le maintien des vaisseaux HEVs dans les ganglions lymphatiques en condition physiologique ont été identifiés. Toutefois, les mécanismes régulant le développement des vaisseaux HEVs au cours de l'angiogenèse tumorale demeurent encore largement inconnus. L'étude des caractéristiques moléculaires des vaisseaux HEV dans les tumeurs doit donc être réalisée à ce jour dans des modèles in vivo, car aucun système cellulaire complexe ne peut y être substitué et le maintien en culture de cellules endothéliales de type HEV est encore extrêmement limité. Les cellules des vaisseaux HEV sont remarquablement plastiques et perdent rapidement leurs caractéristiques phénotypiques en dehors de leur tissu d'origine. Les procédures expérimentales ne peuvent donc pas être remplacées par des méthodes alternatives n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants et susceptibles d'apporter le même niveau d'information. Cependant les analyses moléculaires menées dans le cadre de ce projet permettront de renforcer nos connaissances sur les facteurs clef de maintien de la différenciation de ces cellules et pourraient ouvrir la voie à de nouvelles perspectives de développement et de maintien de ce phénotype dans des modèles de culture cellulaire.

Les modèles de tumeurs pertinents qui ont été identifiés sont des modèles murins d'implantation sous-cutanée, en particulier un modèle de fibrosarcome et un modèle de cancer du sein par implantation sous-cutanée ou greffe orthotopique d'une lignée mammaire PyMT. Ce dernier modèle est particulièrement pertinent puisque les vaisseaux HEV ont été retrouvés chez l'homme dans des cancers du sein. De plus, l'existence de souris transgéniques déficientes en certaines populations immunitaires ou permettant l'élimination in vivo de certaines populations immunitaires, permettra de déterminer le rôle de ces différentes populations dans le développement et la fonction des vaisseaux HEV de tumeur. Seule l'espèce murine offre ces modèles transgéniques. La fonctionnalité des vaisseaux HEV dans les tumeurs traitées ou non ne peut être analysée que par des techniques de "homing" et de microscopie intravitale qui seront donc réalisées sur les animaux à l'issue du développement tumoral. L'ensemble des procédures de croissance tumorale a fait l'objet d'expériences pilotes afin de valider les conditions expérimentales, nombre d'animaux par groupe nécessaire aux analyses et validations statistiques.

Le projet, avec ses différentes étapes, nécessite l'utilisation au maximum de 3510 souris sur 4 ans. Le nombre d'animaux utilisés est réduit à son minimum pour obtenir dans chaque groupe étudié un nombre d'individus suffisants pour réaliser les tests statistiques. Les procédures ont aussi été optimisées afin d'engendrer le moins de stress possible pour l'animal. Les conditions d'hébergement et les méthodes utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible toute angoisse ou dommages durables que pourraient subir les animaux. L'ensemble des procédures sera réalisé sous anesthésie volatile ou anesthésie médicamenteuse pour réduire l'angoisse des animaux. Le suivi des animaux après chaque procédure sera journalier (masse tumorale, poids de l'animal, aspect extérieur) avec interruption de l'expérimentation si l'un des critères d'arrêt est atteint, ce suivi est aussi effectué avec la mise en place d'une fiche SBEA afin de partager les informations concernant ce suivi avec l'ensemble des intervenants auprès des animaux. Pour les analyses fonctionnelles, nous avons développé des techniques d'imageries par microscopie intravitale qui permettent de suivre simultanément plusieurs paramètres et nous permettent donc de réduire le nombre d'animaux utilisés pour atteindre ces données fonctionnelles.

10241 Notre équipe étudie les mécanismes moléculaires et cellulaires qui influencent la vulnérabilité cellulaire à des changements de signalisation médiés par les Récepteurs Tyrosine Kinases (RTKs). Nous avons généré des souris chez lesquelles l'expression d'un RTK (Met) est légèrement augmentée, conduisant ainsi à des tumeurs, de sous-type spécifique, au niveau du foie. Des analyses de marqueurs révèlent que ces souris correspondent à des sous-groupes de patients atteints de cancer du foie soulignant leur intérêt clinique. Nous utilisons ces tumeurs pour réaliser différents criblages à grande échelle, conduisant ainsi à la découverte de gènes impliqués dans ces pathologies.

Ces modèles murins constituent un outil de choix pour :

- 1) apporter une meilleure compréhension dans la Biologie du Cancer, les étapes de formation et /ou de progression tumorale
- 2) identifier des nouveaux biomarqueurs pour affiner les diagnostics cliniques des patients
- 3) identifier des nouvelles thérapies moléculaires spécifiques à ces sous-groupes de patients

Nos projets de recherche sont basés sur un large panel de modèles in vitro, complétés par les modèles murins (décrits ci-dessus) nécessaires pour consolider et élargir les connaissances acquises in vitro dans un contexte physiologique. La qualité de notre plan expérimental, la réalisation d'expériences in vitro en amont des études chez la souris, ainsi que l'étude détaillée du nombre d'animaux nécessaires à l'obtention d'un résultat scientifique valable nous permettent d'optimiser le nombre d'animaux utilisés, prenant ainsi en considération la règle des 3R.

Les objectifs proposés sont parfaitement réalisables sur 5 ans aux vues des différentes ressources financières et humaines disponibles (3 chercheurs statutaires, 1 ITA, 3 chercheurs en stage post-doctoral, 2 étudiants en Thèse et des étudiants en Master). Les personnes affectées au projet sont formées et qualifiées à l'expérimentation animale : 2 chercheurs et 1 ITA (3 formations niveau 1 dont 2 en chirurgie), tous les étudiants en stage post-doctoral et en thèse suivent la formation de niveau 1. Par ailleurs, nous utilisons du matériel de dernière génération et notre établissement

possède un agrément propice à l'expérimentation animale. Ce projet utilisera 344 souris (génétiquement modifiées).

Les souris utilisées dans ce projet sont élevées en groupes sociaux, dans des environnements complexes pour leur permettre de se comporter normalement. Les animaux sont élevés en présence d'objets permettant le raffinement de l'environnement. 5 personnes sont dédiées à l'organisation et l'entretien des animaux et ainsi, tous les jours, l'état sanitaire et environnemental des animaux sont contrôlés. Lorsque les animaux présentent des tumeurs, ils sont euthanasiés. Les tumeurs sont prélevées afin de réaliser les analyses moléculaires, biochimiques, histologiques et des tests biologiques.

Les souris sont maintenues dans des cages "enrichies" (présence de dôme). Les souris sont surveillées quotidiennement par le personnel animalier ou par les membres de l'équipe pour s'assurer des bonnes conditions d'hébergement et de l'état de santé des souris qui sera régulièrement surveillé (3 fois/semaine) et évalué suivant différents critères : poids, pelage, quantité de nourriture consommée, comportement animal qui traduirait une éventuelle souffrance ou angoisse. Des stratégies d'optimisation seront mises en place au cours du projet afin de réduire voire de supprimer la souffrance chez l'animal (enrichissement des cages, acclimatation des animaux aux pièces d'expérimentation). En cas de douleur physique, l'analgésie sera réalisée par administration de paracétamol (200mg/kg, VO).

10242 Ce projet a pour but d'étudier le rôle de CD146 dans le développement de pathologies ischémiques de manière à évaluer l'intérêt de cette nouvelle cible thérapeutique en vue d'une thérapie régénératrice chez l'adulte.

Notre équipe a déjà montré que CD146 soluble est augmenté au cours de l'ischémie du membre et de l'ischémie cardiaque. Ce travail permettra de préciser le rôle de cette molécule dans ces deux contextes ischémiques de façon à pouvoir proposer une nouvelle cible thérapeutique.

La qualité de notre plan expérimental ainsi que l'étude détaillée du nombre d'animaux nécessaires à l'obtention d'un résultat scientifique valable nous permettent d'optimiser le nombre d'animaux utilisés. Ainsi ce projet utilisera 2585 souris.

Notre projet nécessite l'utilisation d'animaux. En effet, l'étude des processus ischémiques n'est pas possible en culture cellulaire. La culture ne permet pas d'analyser les interactions cellules-cellules telles qu'elles sont situées dans le tissu. De plus, en culture, les cellules ne sont pas sujettes au débit et à la pression du sang non plus qu'aux nombreux autres facteurs et signaux qui sont le propre d'un organisme entier et vivant. Par ailleurs, les animaux génétiquement modifiés (transgéniques et knockouts) représentent des atouts pertinents pour obtenir une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans les processus biologiques.

Les souris utilisées dans ce projet sont élevées en groupes sociaux, dans des environnements complexes pour leur permettre de se comporter normalement. Les animaux sont élevés en présence d'objets permettant le raffinement de l'environnement. Les élevages sont effectués au sein de notre établissement agréé et des personnes sont dédiées à l'organisation et l'entretien des élevages et ainsi tous les jours l'état sanitaire et le bien-être des animaux sont contrôlés.

Tout au long de l'expérimentation nous nous attacherons à reconnaître la douleur, la quantifier via une échelle, agir lorsque les critères d'interruption prédéfinis sont atteints, noter dans le registre des animaux les observations faites et les actions entreprises. Ainsi l'ensemble de ces arguments démontre la faisabilité de notre projet.

Le protocole sera arrêté si l'animal présente un mauvais état de santé.

10243 Ces travaux pratiques sont réalisés par les étudiants en L3/S5 de la filière « biologie cellulaire et physiologie ». Le but de ce TP est d'étudier la fonction respiratoire ainsi que quelques mécanismes de sa régulation (chimique et nerveuse).

La réalisation de travaux pratiques (TP) par les étudiants répond aux objectifs pédagogiques définis dans le programme de formation de la Licence de Biologie. Ce TP permet d'explorer les mécanismes de régulation des mouvements respiratoires chez le rat. Le but de ce TP est de permettre aux étudiants de comprendre des méthodes et principes physiologiques fondamentaux de régulations nerveuse et chimique de la respiration in vivo, qui ne peuvent être remplacés par

d'autres outils pédagogiques. Au cours de ce TP, les étudiants détermineront les effets sur les mouvements respiratoires d'une hypercapnie ainsi que d'une stimulation électrique des nerfs vagues sur un modèle animal (rat) anesthésié et analgésié. Les mouvements respiratoires seront étudiés à l'aide d'un capteur de tension externe positionné au niveau de la cage thoracique de l'animal. Une séance de TP se déroulera sur 4h. Le TP débutera par une présentation des méthodologies développées. On soulignera particulièrement la nécessité d'une approche in vivo dans le respect de la règle des 3R avec des procédures expérimentales visant à réduire la souffrance, la douleur et l'anxiété des animaux. Un groupe de TP comprend 16 étudiants qui seront répartis en 8 binômes (1 rat/binôme). Les résultats de tous les binômes seront mutualisés afin que tous les étudiants puissent réaliser une analyse globale des effets observés. Les données seront interprétées à partir des données théoriques développées en cours et feront l'objet d'un compte-rendu scientifique. Pour chaque séance de TP, l'enseignant sera assisté par deux personnels techniques habilités (1 encadrant pour 5 étudiants). Ce personnel formé réalisera l'anesthésie des animaux, la mise en place des procédures permettant le raffinement (analgésie, surveillance de l'état d'endormissement des animaux...) et l'euthanasie des animaux en fin de séance. Le nombre d'animaux utilisés sur une année sera de 72 rats (8 binômes x 9 séances de TP) (un maximum de 144 étudiants/an). La demande d'autorisation portant sur 5 années, il est prévu 360 rats au total. Ce nombre sera revu à la baisse en fonction du nombre d'étudiants inscrits dans le module. Enfin, les animaux utilisés pour ces travaux pratiques seront des rats de réforme.

10244 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 adrénergique pouvait améliorer la survie des patients par l'intermédiaire d'une réponse tissulaire mieux adaptée.

Afin de confirmer ou infirmer cette hypothèse, nous souhaitons tester les effets d'un β 1-bloquants adrénergiques chez des rats septiques. Pour cela, nous serons amenés à employer un modèle de sepsis internationalement reconnu, le modèle par administration de lipopolysaccharide (LPS). Le β 1-bloquant testé sera l'Aténolol et les rats seront réparties en 4 groupes (Contrôle, Contrôle-Aténolol, LPS, LPS-Aténolol).

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 rongeurs 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, foie, reins, aorte, artères, muscles squelettiques) effectués sur chaque animal. Nous nous sommes également limités à l'utilisation d'un traitement (couramment employé chez l'homme), qui en cas de résultats positifs permettra 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 rats 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 240 rats pour cette étude.

10245 Le diabète de type 1 est une pathologie associée à des complications progressives au niveau du Système Nerveux Central qui sont dénommées Encéphalopathie Diabétique (ED). Bien que cette complication soit particulièrement fréquente chez le diabétique de type 1, l'étiologie de l'ED n'est toujours pas claire. Certaines données semblent cependant indiquer qu'il puisse s'agir d'un

processus multifactoriel impliquant les effets indésirables de l'hyperglycémie chronique au niveau cérébral, notamment au niveau mitochondrial. Le présent projet vise ainsi à comprendre et caractériser, par des approches de protéomiques et métabolomiques au niveau de structures cérébrales spécifiques, les mécanismes responsables du développement de la ED, à différents stades de développement, chez un modèle rongeur de diabète de type 1 expérimentalement induit. Une attention particulière sera portée sur l'expression région spécifique de marqueurs mitochondriaux. L'étude décrite dans le présent projet sera réalisée pour le compte d'un laboratoire académique dans le cadre d'une recherche fondamentale. L'analyse des marqueurs mitochondriaux sera réalisée sur des prélèvements de cortex, d'hippocampe, d'hypothalamus et de cervelet, réalisés 3 semaines (étude court terme) ou 12 semaines (étude long terme) après induction du diabète de Type 1 par une administration unique de Streptozotocine (STZ, 70 mg/kg). Au cours des 3 ou 12 semaines d'étude, le poids des animaux et leur prise alimentaire seront mesurés au moins deux fois par semaine et leur glycémie sera mesurée une (étude court terme) ou deux fois (étude long terme) par semaine.

L'étude sera menée sur un total de 70 rats Wistar Han mâles, séparés en 6 groupes expérimentaux (3 pour l'étude court terme, 3 pour l'étude long terme) :

1) Etude court terme (3 semaines)

- Rats non diabétiques (n=5)
- Rats diabétiques non traités (n=15)
- Rats diabétiques traités à l'insuline (traitement administré les 4 derniers jours avant euthanasie; n=15)

2) Etude long terme (12 semaines)

- Rats non diabétiques (n=5)
- Rats diabétiques non traités (n=15)
- Rats diabétiques traités à l'insuline (traitement administré les 4 derniers jours avant euthanasie; n=15)

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. Il s'agit d'un modèle de diabète de type 1 chez le rat induit par une administration unique de STZ. Le protocole a été planifié de façon à limiter au maximum tout stress et tout inconfort pour les animaux. Les animaux seront hébergés par deux et un enrichissement du milieu sera assuré par l'ajout de briquettes en bois. Enfin, compte-tenu du développement du diabète de type 1, un suivi journalier particulièrement étroit des animaux permettra une action rapide en cas d'atteinte des points limites établis. Par ailleurs, une attention toute particulière sera apportée à la fréquence de change des cages, au minimum, une fois tous les deux jours, les animaux diabétiques étant caractérisés par une forte hyperdypsie associée à une polyurie.

- Réduction : Le nombre d'animaux utilisés par groupe a été défini comme le nombre minimum nécessaire pour être en mesure de mettre en évidence une différence statistiquement significative sur les paramètres étudiés.

- Remplacement : 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'efficacité réelle d'un composé sur l'encéphalopathie diabétique.

10246 L'étude décrite dans le présent dossier sera réalisée dans le cadre d'une prestation contractuelle pour le compte d'un client qui souhaite tester l'impact d'un stimulateur des guanylates cyclases solubles (appelé composé X) sur l'homéostasie énergétique chez la souris soumise à un régime induisant l'obésité (DIO) dans des conditions de thermo neutralité. La présente étude vise ainsi à étudier les mécanismes d'action du composé X pouvant expliquer les effets bénéfiques sur le métabolisme observé chez la souris DIO en condition de thermo neutralité lors d'études précédentes. Dans ce but, le composé X sera administré par voie orale (composé X mélangé à la nourriture) pendant 59 jours et l'impact de ce traitement sera étudié sur : i) les apports énergétiques via un suivi régulier de la prise alimentaire, ii) les dépenses énergétiques via l'étude des échanges respiratoires, iii) le poids corporel et la composition corporelle, iv) le métabolisme glucidique

(mesures de glycémie et test de tolérance au glucose), et v) le métabolisme lipidique (test de tolérance aux lipides). Au terme de l'étude, un prélèvement d'organes d'intérêt (tissus adipeux brun et blanc, foie, muscle) ainsi que du plasma permettront d'étudier sur un plan moléculaire les effets potentiels du composé X. Le traitement sera administré aux souris après 8 semaines de régime enrichi en graisse (Régime High Fat ou HF; hormis pour les souris contrôles nourries avec une alimentation standard), et les souris resteront sur le même régime tout au long du traitement.

Pour cette étude, un total de 48 souris sera utilisé, divisée en 4 groupes expérimentaux :

- Groupe 1 : C57Bl/6NTac / alimentation standard (n=12)
- Groupe 2 : DIO C57Bl/6NTac / HF 60% (n=12)
- Groupe 3 : DIO C57Bl/6NTac / HF 60% + composé X (n=12)
- Groupe 4 : DIO C57Bl/6NTac / HF 60% + composé de référence (n=12)

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 divers composés pharmaceutiques ou agroalimentaires sur l'homéostasie énergétique. Il s'agit d'un modèle de souris rendues obèses et pré diabétiques via une alimentation enrichie en graisse, correspondant à la cible humaine visée. 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 et un enrichissement du milieu sera assuré par l'ajout de petites « mouse-house ». Enfin, bien que le protocole soit relativement peu invasif, un suivi journalier des animaux permettra une action rapide en cas d'atteinte des points limites établis.

- Réduction : Le nombre d'animaux utilisés par groupe a été défini comme le nombre minimum nécessaire pour être en mesure de mettre en évidence une différence statistiquement significative sur les paramètres étudiés.

- Remplacement : 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'efficacité réelle d'un composé sur un l'homéostasie énergétique.

10247 Les grands groupes pharmaceutiques et les sociétés biotechnologiques souhaitent avoir de plus en plus tôt des informations pharmacologiques fonctionnelles sur leurs molécules en développement pour traiter des maladies du Système Nerveux Central ou pour traiter la douleur. D'autre part, pour une meilleure appréhension (ou prédictibilité) d'éventuels effets secondaires, les agences réglementaires (FDA, EMA) exigent une connaissance complète des cibles et des mécanismes d'actions associés à ces nouvelles molécules pour leur mise sur le marché. Avant les phases précliniques réglementaires, il n'est pas possible de tester les effets des molécules sur des animaux, à la fois pour des questions de quantités disponibles des molécules (quelques milligrammes le plus souvent) et pour des questions éthiques (aucune idée sur les effets éventuels qui pourront être observés).

La grande quantité d'information scientifique disponible sur le fonctionnement du SNC des rats et souris, et les développements de l'ingénierie génétique et technique sur les rongeurs ont permis de mieux comprendre les gènes et réseaux de neurones chez ces espèces. La conservation au cours de l'évolution, chez les mammifères, de ces gènes et réseaux, a poussé à une meilleure compréhension de nos pathologies. Et de fait, le recours à ces animaux est devenu un outil puissant pour comprendre le fonctionnement et chercher des médicaments améliorant la vie des patients.

Nos scientifiques ont des années d'expériences dans l'évaluation fonctionnelle des propriétés pharmacologiques et/ou toxiques des molécules sur la base de mesures électrophysiologiques ex vivo du système nerveux central.

Nous pourrions, ainsi au cours des 5 prochaines années, aider à mieux comprendre et documenter, les mécanismes d'action, les effets de composé sur le SNC et les phénotypes des modèles d'animaux génétiquement modifiés mimant des pathologies humaines.

Pour ce faire, nos laboratoires utilisent deux types de technique :

- Multi-Electrode Array : enregistrements extracellulaires multipoints. Technique parfaitement adaptée pour enregistrer des réseaux de neurones.

- Patch-Clamp : enregistrements intracellulaires. Technique parfaitement adaptée pour l'investigation des canaux ioniques et des phénomènes de transmission synaptique et de plasticité synaptique à l'échelle du neurone.

Ces compréhensions nécessitent de pouvoir réaliser des observations sur des réseaux neuronaux natifs et connectés, « donc plus physiologique », pour cela nous utilisons des tissus fraîchement prélevés sur rat ou souris d'élevage, car il n'est pas possible, *in silico*, de reproduire la complexité de ces connexions et/ou la particularité d'un neurone spécialisé.

Par la même et après notre validation scientifique nous construisons une étude comme suit :

1* une étude pilote, en petit effectif d'animaux, incluant 4 rats ou 4 souris; au cours de laquelle les animaux seront sacrifiés rapidement et les organes maintenus en vie dans un liquide type liquide céphalo-rachidien pour réaliser les enregistrements électrophysiologiques en utilisant les techniques Multi-Electrode Array et Patch-Clamp. Avec une analyse statistique one-way ANOVA (avec test de comparaison multiple) ou un t-Test non apparié, nous pourrions évaluer la taille de l'échantillon suivant pour atteindre une significativité statistique acceptable. Si cette significativité n'est pas atteinte, l'étude sera suspendue,

2* Si la significativité attendue est présente, l'étude pilote pourra donc être suivie par :

- soit l'injection de futur médicament, à des groupes de 10 rats Sprague Dawley ou 10 souris C57Bl/6J, Afin de limiter le stress des animaux nous nous entraînerons les animaux à être manipulés, limiterons à une administration par jour pendant 21 jours maximum. Après euthanasie grâce à une méthode éthique, effectuée par du personnel dûment formé, nous pourrions réaliser le prélèvement terminal et ainsi mesurer l'efficacité, *ex vivo* de l'exposition de la molécule sur le SNC,

- soit une mise en culture primaire de cellule nerveuse de 10 rats Sprague Dawley ou de 10 souris C57Bl/6J. Celles-ci seront obtenues après anesthésie et euthanasie grâce à une méthode éthique, effectuée par du personnel dûment formé, nous pourrions réaliser, alors, le prélèvement terminal de cellules nerveuses qui seront mises en culture.

- soit d'une caractérisation électro physiologiques de lignée d'animaux génétiquement modifiés au cours de laquelle les animaux, 10 WT and 10 OGM, seront rapidement, décapités, prélevés et leur caractérisation électro physiologiques effectuée. Ces animaux pouvant souffrir de phénotype dommageable, leur hébergement fera l'objet d'une attention particulière avec un régime alimentaire adapté aux OGMs, de l'enrichissement spécifique et enfin une surveillance renforcée seront mise en place. Quand leur phénotype peut être dommageable, nous choisirons de ne recevoir que les animaux asymptomatiques ou pré symptomatiques et établirons le point limite de fin d'étude précoce pour limiter leur souffrance éventuelle.

La totalité des 750 études sur 5 ans aboutiront à une utilisation de 14200 rats et souris. Nous avons donc 19 animaux par étude, ce nombre représente la moitié du nombre d'animaux nécessaire pour une étude toxicologique dite « classique ».

Dans ce contexte, l'évaluation *ex vivo* des effets pharmacologiques fonctionnels et/ou toxiques sur des explants de tissus vivants, exposés de façon chronique ou de façon aiguë, est la meilleure approche car elle permet :

- de limiter le nombre d'animaux à tester, car nous utilisons un même animal pour plusieurs mesures et plusieurs conditions d'expositions, ce qui diminue le besoin en nombre d'animaux,

- de faire, dans un premier temps, une analyse pharmacologique/toxicologique précise à l'échelle du tissu et/ou du neurone et/ou de la protéine tout en s'affranchissant des problèmes de passage de la BHE et des problèmes de Pharmacocinétique,

- de caractériser rapidement les modèles d'animaux génétiquement modifiée qui pourrait servir à la compréhension de pathologie humaine

10248 L'utilisation de biomatériaux pour favoriser la cicatrisation nécessite une connaissance approfondie du comportement de ces derniers chez l'hôte. Lors de leur utilisation, les biomatériaux peuvent émettre des débris dont il faut connaître le comportement dans l'organisme avant d'envisager leur application clinique. En effet, ces dégradations peuvent entraîner des rejets aseptiques (essentiellement inflammatoires) aboutissant à de graves complications nécessitant de nouvelles interventions. Aussi leur implantation *in-vivo* est un prérequis indispensable à leur utilisation clinique. Cette implantation permet d'étudier la réaction de l'intégralité des systèmes physiologiques

de l'hôte vis-à-vis de biomatériaux prometteurs préalablement étudiés et caractérisés par méthodes in-vitro. La complexité des systèmes et leur intégration ne permet pas l'utilisation de méthodes alternatives. Afin de mimer au mieux l'environnement réagissant aux débris de biomatériaux générés en site prothétique nous proposons d'utiliser le modèle des poches à air (Air pouch) sous cutanées permettant la genèse d'une poche fibreuse mimant celle qui encapsule les pièces prothétiques ou les articulations artificielles (ex : Prothèse Totale de Hanche). Ce modèle permet d'évaluer le potentiel inflammatoire des biomatériaux ou de leur débris d'usure par mesure de l'infiltrat cellulaire inflammatoire mais aussi par mesure de la production de médiateurs de l'inflammation dans l'exsudât. Ce modèle est également adapté à l'étude du potentiel de molécules anti-inflammatoires innovantes connues pour présenter un effet anti-inflammatoire in-vitro et destinées à limiter les effets néfastes de cette réponse de l'hôte. Pour cela, 230 souris au maximum seront étudiées afin de démontrer cet effet. La complexité des systèmes et leur intégration ne permet pas l'utilisation de méthodes alternatives. Nous proposons d'utiliser le modèle d'Air Pouch car ce modèle est couramment employé en recherche sur les biomatériaux et n'entraîne pas de souffrances. Toutes les précautions seront prises afin de réduire les effectifs utilisés : pour que les valeurs obtenues soient recevables sur le plan statistique, une étude préliminaire sera réalisée sur un nombre réduit d'animaux afin de calculer le nombre le plus faible d'animaux nécessaire à l'obtention d'un résultat exploitable avec un maximum de 10 individus par groupe. A chaque manipulation, les animaux seront anesthésiés afin de limiter le stress et la douleur. Au cours de l'anesthésie, les signes vitaux seront surveillés visuellement (fréquence cardiaque et fréquence respiratoire) et les animaux seront maintenus sur un lit chauffant. Après chaque temps d'injection, une visite quotidienne sera effectuée. Une surveillance sera réalisée pendant 1 heure suivant le temps expérimental pour s'assurer l'absence de tout mal être lié à l'injection des produits à tester.

10249 L'Ecole des Neurosciences se propose de former de nouveaux chercheurs sur les méthodes modernes de mesure d'activités neuronales impliquées dans les mécanismes de prises de décision, de sommeil et d'exécution motrice (aucun modèle in vitro ne peut substituer l'animal dans ces cas d'études).

Sujet 1 : Activités cérébrales et prise de décision.

Notre vie quotidienne est une chaîne complexe et discontinue de décisions et d'actions qui définissent nos comportements. Face à une situation de choix, chaque individu tendra à sélectionner la meilleure action possible parmi l'ensemble des alternatives possibles. Ce processus de « prise de décision » intervient sur la base d'une évaluation subjective propre à chaque individu des coûts et bénéfices de chaque action. Le cortex préfrontal cérébral a émergé comme un acteur potentiel de ce processus, cependant les mécanismes synaptiques et neuronaux restent peu connus à ce jour.

Nous proposons d'étudier chez la souris ces divers mécanismes. Les animaux impliqués dans ce projet subiront une chirurgie (implant de fenêtre crânienne) puis, 4 semaines après, des tests comportementaux associés à de l'imagerie bi-photon permettront de mettre en évidence, les circuits neuronaux impliqués dans cette prise de décision et d'en extraire les mécanismes neuronaux sous-jacents.

Sujet 2 : Le sommeil, modèle pour comprendre et manipuler l'activité neuronale cérébrale.

Les troubles du sommeil et de l'éveil sont fréquents et surtout après un accident vasculaire cérébral (AVC) ils sont liés à une réadaptation difficile et à peu de résultats sur le long terme. Il a été rapporté que les patients ayant subi un AVC présentent une architecture de sommeil anormale par rapport à des sujets normaux. Le cerveau blessé subit une réorganisation impressionnante due à l'induction progressive de mort cellulaire qui touche les structures impliquées dans la mémorisation.

Pendant cette phase cruciale de récupération tissulaire, le sommeil peut donc jouer un rôle, cependant, les mécanismes d'action sont mal connus.

Nous proposons par le biais de méthodes modernes permettant de mesurer les activités neuronales pendant le sommeil en conditions normales de caractériser et distinguer les cycles de sommeil et d'éveil chez la souris, ce qui permettra pour de futures études de comprendre quels sont les mécanismes affectés lors de troubles du sommeil. Pour cela, les animaux impliqués subiront une

chirurgie (implantation d'électrodes) puis, 4 semaines après, des mesures électrophysiologiques seront effectuées in vivo sur animal éveillé puis endormi naturellement.

Sujet 3 : Exécution motrice

Plusieurs structures cérébrales ont un rôle crucial dans la planification, l'initiation et l'exécution des actions motrices que nous entreprenons quotidiennement, mais la dynamique de ces réseaux cérébraux ainsi que leurs modes de fonctionnement exact pendant un mouvement sont loin d'être connus. Le dysfonctionnement de ces réseaux entraîne des maladies motrices graves qui affectent la capacité d'initier une action ou au contraire de supprimer un mouvement non désiré. Ces déficits moteurs sont identifiables dans des pathologies humaines comme la maladie de Parkinson ou la chorée de Huntington.

Nous proposons par le biais d'une approche pluridisciplinaire combinant enregistrements d'activités neuronales avec stimulation optogénétique de définir les relations fonctionnelles à l'intérieur de ces circuits neuronaux et de comprendre leurs implications dans l'exécution d'un mouvement. Pour cela, les animaux employés (rats et souris) subiront une chirurgie (injection virale) puis 2 semaines après, des analyses électrophysiologiques seront réalisées in vivo sur animaux anesthésiés.

La durée de ce projet de formation est de 5 ans et le modèle rongeur sera privilégié :

-Des souris sauvages C57BL/6J (au nombre de 40 par an, soit 200 total)

-Des souris transgéniques VGAT-cre (au nombre de 40 par an, soit 200 total) qui permettent un ciblage optogénétique plus précis de certaines populations neuronales.

-Des rats Sprague Dawley (au nombre de 10 par an, soit 50 total) seront préférentiellement utilisés pour le sujet 3 car les séquences motrices qui peuvent être enregistrés chez les rats sont plus complexes et plus reproductibles que chez la souris.

Afin de respecter la règle des 3R, un même animal sera utilisé pour mesurer plusieurs paramètres lorsque cela sera possible. Des procédures opératoires seront développées de façon à réduire au maximum l'inconfort de l'animal. Il est important de noter i) Réduction : il nous est nécessaire de démontrer les techniques puis de les faire pratiquer par les étudiants, nous ne pouvons donc pas travailler avec moins d'animaux ; ii) Raffinement : les méthodologies utilisées dans ce projet impliquent la mise en œuvre de toutes les stratégies expérimentales et pharmacologiques disponibles actuellement pour réduire le nombre d'animaux utilisés mais aussi minimiser les possibles effets délétères pour ceux-ci, avec un respect particulier de la notion de points limite (critères d'interruption en cas de souffrance des animaux) ; (iii) Remplacement : les mesures d'activités cérébrales au cours de prise de décision, d'exécution motrice et de sommeil ne peuvent être étudiés avec des modèles in vitro de neurones en culture, nous ne pouvons donc pas remplacer ce modèle animal.

Ce projet a pour but de former les étudiants afin qu'ils soient en mesure de réaliser au mieux les procédures qu'ils auront apprises et transmettre ainsi ces techniques dans leur laboratoire d'origine. Une meilleure connaissance des nouvelles techniques de chirurgie et d'imagerie leur permettra de réduire le nombre d'animaux utilisés lorsqu'ils voudront réaliser ces techniques pour leurs besoins de recherche.

10250 L'amélioration des performances de croissance en production avicole s'est effectuée grâce à la sélection génétique et à une optimisation de l'alimentation, mais elle a été réalisée au détriment de la santé des animaux associée à une augmentation de l'incidence des maladies infectieuses. La coccidiose, causée par des parasites du genre *Eimeria*, représentent le premier fléau parasitaire de l'aviculture induisant des pertes de production ayant de graves conséquences économiques dues à de la mortalité mais surtout de la morbidité. L'infection par *Eimeria* conduit à une inflammation intestinale importante. Cependant, la nature des différents acteurs cellulaires et moléculaires ainsi que les mécanismes précis conduisant à cette inflammation nécessitent d'être mieux connus. L'inflammation intestinale a pour conséquence une rupture de la barrière épithéliale qui, à l'homéostasie, protège l'animal contre l'invasion par les bactéries commensales ou pathogènes du microbiote intestinal. Ainsi, il a été montré une prédisposition des oiseaux infectés par *Eimeria* à développer des pathologies secondaires telles que l'entérite nécrotique due à *Clostridium perfringens* ou des affections osseuses. D'anciennes études (1975) ont montré que la présence du microbiote est un élément déterminant puisque la physiopathologie de la coccidiose due à *E. tenella*

n'est pas reproduite chez des poulets exempts de microbiote intestinal. L'ensemble de ces données soutiennent l'hypothèse d'une translocation systémique de bactéries du microbiote intestinal après une altération de la barrière intestinale causée par *Eimeria*. L'alimentation, en plus de son apport en nutriments, joue un rôle majeur dans la santé et l'étanchéité de la barrière intestinale en agissant entre autres sur la composition du microbiote et sur l'intégrité de l'épithélium. Dans une deuxième partie de ce projet non abordé dans cette saisine, nous utiliserons une alimentation alternative comme levier pour améliorer la santé digestive en favorisant le maintien de l'homéostasie intestinale et en limitant l'incidence de l'infection parasitaire.

Ici, nous proposons d'étudier par une approche intégrée comment certaines bactéries présentes dans l'intestin, et à ce stade sans danger pour l'hôte, vont profiter d'une infection parasitaire très fréquente chez la volaille (coccidiose) pour pénétrer puis disséminer dans l'organisme, ce qui peut conduire à une infection sévère.

L'objectif premier de ce projet est d'étudier l'importance du microbiote sur 1) la physiopathologie de l'infection et 2) sur la perméabilité intestinale et la translocation bactérienne.

Pour ce faire nous utiliserons au maximum 960 poulets (420 axéniques et 540 EOPS (exempt d'organisme pathogène spécifique))

Dans les études préliminaires, nous avons observé une diminution de la charge parasitaire (nombre d'oocystes dans les caeca) chez les animaux axéniques par rapport aux animaux EOPS.

Nous allons donc étudier l'influence du microbiote intestinal sur le parasite *Eimeria tenella*. Pour ce faire, nous utiliserons 120 animaux supplémentaires (40 animaux EOPS et 80 animaux axéniques)

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

Remplacement : l'étude de la physiopathologie de l'infection par *Eimeria tenella*, de la perméabilité intestinale et de la translocation bactérienne nécessite l'utilisation d'animaux et ne peut être réalisée in vitro.

Réduction : Le nombre d'animaux par lot est adapté aux buts de cette expérimentation pilote, preuve de concept.

Raffinement : Les poulets seront hébergés en isolateurs ou en cages adaptés à leur taille, dans des conditions environnementales contrôlées, avec nourriture et eau à volonté et disposeront d'un enrichissement social et comportemental (petites plaques en inox suspendues ce qui permet aux animaux de piquer dedans). Une visite quotidienne est réalisée dans la salle expérimentale afin de surveiller l'état général des animaux et l'apparition d'éventuels symptômes liés à la maladie : plumes ébouriffées, prostration, ailes pendantes. Ces symptômes arrivent souvent vers le 6ème jour d'infection. Même si les doses administrées sont déterminées de manière à éviter toute pathogénicité qui entraverait le développement cette étude, le point limite défini est l'observation d'un état de prostration tel que l'animal ne s'alimente plus.

10251 Les chloroparaffines (CP) sont des composés organiques stables et extrêmement complexes par leur diversité. Elles sont issues de la distillation du pétrole et sont massivement utilisées entre autres comme plastifiants. Très présentes dans les milieux, elles sont résistantes à la dégradation et à l'oxydation, de sorte qu'elles sont classées comme persistantes. De leurs propriétés physiques résulte une concentration croissante au long des chaînes trophiques et une accumulation dans l'organisme humain.

On distingue les chloroparaffines à chaînes courtes, à chaînes moyennes et à chaînes longues. L'interdiction des chloroparaffines à chaînes courtes car possiblement cancérigènes, se traduit par un glissement vers la production et l'utilisation de chloroparaffines à chaînes moyennes (considérées comme moins toxiques) et courtes non soumises à restriction.

L'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) s'est emparée de la question de l'évaluation du risque lié à l'exposition alimentaire de la population aux chloroparaffines.

Les processus d'absorption, métabolisation, stockage et excrétion des chloroparaffines, qui conditionnent le niveau de contamination des produits alimentaires ne sont que très partiellement élucidés. Cette méconnaissance place les autorités de surveillance dans l'impossibilité d'expliquer les teneurs élevées rapportées, mais aussi les éleveurs de prévenir la contamination des produits animaux.

Ce projet vise à étudier le transfert des chloroparaffines vers les produits animaux avec comme modèle celui de la poule pondeuse. Les chloroparaffines étant des molécules lipophiles, leur niveau de transfert vers les organismes animaux est très vraisemblablement lié au métabolisme lipidique de l'animal exposé. On disposera ainsi d'un jeu de données sur la poule pondeuse qui devrait permettre une transposition du modèle de cinétique de contamination à d'autres espèces.

Un total de 80 poules sera élevé de l'âge de 20 à 26 semaines (âge de l'entrée en ponte). Parmi celles-ci un lot expérimental sera exposé à un mélange technique de chloroparaffines qui sera incorporé dans l'aliment et confronté à un lot témoin.

Afin de contrôler la dose de contaminant délivrée à chaque animal, les poules seront élevées en cages individuelles. Pour établir la cinétique de contamination des différentes composantes de l'animal, des poules contaminées et des poules témoins seront régulièrement euthanasiées pour analyser la teneur en chloroparaffines du plasma, des muscles, du gras abdominal, du foie, des fientes et des œufs. Les performances de ponte seront enregistrées.

Réduction :

Le nombre d'animaux a été déterminé de sorte qu'il soit suffisant pour disposer d'un échantillon de tissus statistiquement correct pour tirer des conclusions significatives. De plus l'élevage en cages individuelles permet de limiter le nombre d'animaux mis en expérimentation. Sur les 80 poules prévues, 10 sont surnuméraires et permettront de prendre en compte une mortalité éventuelle ou une absence de ponte. Ces 10 poules seront commercialisées à des éleveurs.

Raffinement :

Le niveau de contamination a été choisi sur la base d'expérimentations sur poules pondeuses et les connaissances sur les doses minimales causant des effets néfastes (source : littérature). Ainsi le niveau d'exposition envisagé n'est susceptible de détériorer ni la santé ni le bien-être des animaux.

Les poules seront placées dans des cages grillagées, contiguës et enrichies d'un pondoir. Elles feront l'objet d'une surveillance quotidienne.

Remplacement :

Compte tenu de l'objectif du projet et de l'absence de données sur la contamination des poules pondeuses et des œufs avec les chloroparaffines, le modèle animal ne peut pas être substitué par un modèle d'étude *in vitro* ou *in silico*. Toutefois, cette étude permettra de disposer d'un jeu de données sur la poule pondeuse et de transposer le modèle de cinétique de contamination à d'autres espèces.

10252 Le chondrosarcome est un cancer rare, qui représente un véritable défi. À ce jour, ni la chimiothérapie, ni la radiothérapie n'affectent la croissance de la tumeur. Le seul traitement efficace reste la résection de la totalité de la tumeur. Cette chirurgie lourde, peut être handicapante pour le patient ; de plus du fait de la localisation de la tumeur proche des vaisseaux et nerfs il n'est pas rare que le chirurgien ne puisse enlever toute la masse tumorale entraînant des rechutes locales ou à distance. C'est pour cela qu'il est nécessaire de trouver de nouvelles alternatives afin d'aider les médecins à soigner au mieux leurs patients.

Le système immunitaire peut reconnaître le cancer comme étant étranger, il est ainsi capable de le détruire. Mais les cellules cancéreuses mettent en place des mécanismes pour freiner ou contourner le système immunitaire et pouvoir progresser à nouveau.

Le but de nouvelles immunothérapies est d'activer le système immunitaire ou alors de lever les freins déployés par les cellules tumorales, pour permettre la destruction des cellules cancéreuses par les cellules de l'immunité.

Dans le chondrosarcome, la composition de l'environnement immunitaire présent autour de la tumeur joue un rôle dans la progression tumorale.

Le but de ce projet est d'identifier une approche d'immunothérapie efficace dans le chondrosarcome qui soit transposable aux patients.

Des analyses d'échantillons de patients ainsi que des expériences *in vitro* ont montré la validité d'une approche ciblant soit les macrophages (sous type de population immunitaire), soit les points de contrôle immunitaires. Utilisant des lignées cellulaires, *in vitro*, des modèles de coculture peuvent être mis en place ; les cellules tumorales sont mises au contact de cellules immunitaires permettant

de re-cr  er un environnement semblable à celui observé chez les patients. Ces modèles permettent de tester différentes thérapies in vitro.

Ces expériences permettant de valider l'immunothérapie dans le chondrosarcome doivent être poursuivies dans un modèle animal pourvu d'un système immunitaire plus complexe que celui de nos modèles cellulaires.

Le modèle de chondrosarcome de rat mime la pathologie humaine et est immunocompétent. Du fait de son mimétisme avec le chondrosarcome humain, ce modèle fournit des données essentielles à la mise en place d'un futur essai clinique.

Ce modèle est obtenu par implantation d'un greffon tumoral au niveau du tibia de l'animal (lieu d'veloppement tumoral chez l'homme). Afin de réduire au maximum la douleur causée à l'animal, un antidouleur sera administré avant la chirurgie réalisée sous anesthésie générale.

Notre projet s'articule en 3 grandes procédures.

La première consiste en la réactivation du modèle tumoral à partir de tumeur congelée. Les tumeurs ainsi obtenues permettront de greffer les rats des différents groupes de traitement avec un meilleur taux de prise (de l'ordre de 90%). La tumeur fraiche ainsi obtenue permettra de greffer 50 rats pour les procédures suivantes. Les rats ne développant pas de tumeur seront réutilisés en tant que contrôles sains.

Puis nous déterminerons la dose efficace de traitement. En effet, les approches immunothérapeutiques n'étant pas encore bien décrites chez les rats et la dose efficace de chaque composé n'étant pas connue, 3 doses seront testées par traitement sur une faible cohorte d'animaux (20 animaux au maximum). Nous agissons par étape afin de réduire au maximum le nombre d'animaux.

Finalement nous analyserons l'efficacité thérapeutique de trois approches immunomodulatrices : nous testons une approche ciblant les macrophages (cellules du système immunitaire capable de reconnaitre la tumeur), une ciblant les checkpoints immunitaires (« point de contrôle immunitaire » ou freins mis en place par les cellules tumorales) et la mort immunogène (rendre à nouveau les cellules tumorales visibles par le système immunitaire) sur différents groupes d'animaux.

Chaque composé immunomodulateur sera évalué contre chimiothérapie de référence sur groupe maximum de 50 animaux. Nous utiliserons le nombre d'animaux minimum permettant d'obtenir des résultats statistiques qui nous permettront de prouver avec certitude l'effet anti-tumoral des thérapies.

Nous reproduirons cette expérience si le traitement entraine une efficacité anti-tumorale pour être sûr que les résultats ne soient pas dus au hasard.

Dans ce projet, les traitements sont administrés par voie intrapéritonéale et nous prendrons soin de stresser au minimum l'animal. Après chaque injection le rat recevra une « friandise ». L' tat général et le comportement des animaux seront suivis quotidiennement. La taille des tumeurs sera mesurée deux fois par semaine, moments auxquels nous serons attentifs à tout signe de douleur potentiel. En cas de signes de douleurs chez l'animal, une injection d'antidouleur morphinique en sous-cutanée sera effectuée. Leur milieu sera enrichi d'objets à grignoter, de cachettes et d'une vie sociale avec d'autres de leurs congénères afin de les distraire.

Des analyses sur coupes tumorales permettront de décrire à la fois la tumeur et l'environnement immunitaire en réponse au traitement. Des analyses de sang permettront de vérifier que le traitement a permis de réactiver le système immunitaire et cause un ralentissement de la progression tumorale

Ces analyses nous permettront d'adapter la suite de notre projet en fonction des résultats obtenus afin de s'orienter vers les thérapies les plus efficaces.

Durant ce projet d'une durée de 5 ans, nous utiliserons un maximum de 414 rats.

Ce projet peut aboutir à de nouveaux traitements du chondrosarcome, les données générées au cours de cet essai permettront de proposer une alternative beaucoup moins invasive que la chirurgie aux patients atteints de cette maladie. Notre projet est donc véritablement dédié au transfert rapide de nouvelles thérapies vers le lit du patient, et le passage par une phase d'expérimentation animale est nécessaire.

10253 1-Rationnel et objectifs du projet : Le succès révolutionnaire des nouvelles immunothérapies du cancer démontre l'importance de l'étude du système immunitaire dans la progression des tumeurs et la réponse aux traitements. Nos travaux se portent sur l'étude de la régulation moléculaire de la fonction d'une population immunitaire nommée lymphocytes. Nous avons récemment identifié le rôle crucial d'une nouvelle protéine (X) dans régulation de l'immunité anti-cancéreuse. Dans ce projet, nous souhaitons utiliser des modèles murins déficients pour cette protéine, afin de décrypter sa fonction dans la biologie des lymphocytes, dans le contexte du cancer. Les animaux déficients pour X seront transplantés avec des cellules cancéreuses, et la croissance tumorale, ainsi que l'effet des thérapies anti-cancéreuses, seront mesurées. De plus, nous étudierons les fonctions potentielles de cette protéine dans les lymphocytes T humains dans un modèle de souris humanisées.

2- Retombées attendues dans les domaines de la cancérologie et de l'immunologie : Nos modèles d'étude constituent une opportunité unique de décrypter la régulation moléculaire de la biologie des lymphocytes. Nous espérons de ce fait mettre en évidence de nouveaux rôles pour la protéine X dans le système immunitaire et dans la réponse aux nouvelles thérapies du cancer, ainsi que découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques pour le traitement du cancer.

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

Nous allons tout d'abord effectuer un certain nombre d'expériences in vitro. Cependant, la validation de nos résultats nécessitera une série d'expériences in vivo pour mesurer la fonction de la protéine X sur la croissance tumorale. À notre connaissance, et malgré les progrès récents dans les domaines de la culture cellulaire et de la biologie computationnelle, l'étude de la croissance du cancer et la validation des cibles médicamenteuses potentielles ne peuvent actuellement pas être remplacées par des systèmes in vitro fiables. Pour chacune des procédures expérimentales, le nombre d'animaux a été réduit au minimum nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement interprétables et reproductibles. Une définition précise des points limites et une surveillance adaptée des animaux par des personnels compétents permet de limiter au maximum toute souffrance animale. De plus, nous avons choisi d'utiliser des cellules tumorales largement décrites dans la littérature, dont la croissance ne provoque pas de douleurs importantes, et n'induit pas de phénomène de métastases, limitant ainsi les effets délétères du cancer.

Le nombre maximal de souris utilisées dans ce projet est de 272.

10254 Ce projet d'une durée de cinq ans consiste à explorer par électrochimie et électrophysiologie les conséquences neurologiques d'un traumatisme crânien (TC) sévère chez le rat. Le traumatisme crânien (TC) est la première cause de handicap chez les moins de 40 ans et l'étude de ses conséquences comportementales et neurologiques est une priorité. Si plusieurs modèles de TC léger et modéré sont disponibles actuellement, l'étude du TC sévère est encore peu développée. Le TC est une pathologie multifactorielle qui peut faire intervenir des paramètres périphériques comme la pression artérielle, la fraction inspirée d'oxygène, la fréquence respiratoire et cardiaque. Elle ne peut pas être modélisée par des approches ex vivo ou post-mortem à l'heure actuelle. Un TC sévère chez l'homme correspond à un choc capable de provoquer un arrêt respiratoire, une perte de conscience de plus de trente minutes et souvent, des déficits neurologiques de long terme. Il existe peu de modèles animaux permettant de reproduire cette pathologie et de comprendre les mécanismes neurobiologiques responsables des lésions et des déficits observés chez les patients. La recherche clinique est difficile car chaque traumatisme est un cas particulier de par le site d'impact, la présence de complications comme l'hémorragie méningée, l'œdème cérébral, les défaillances cardiaques ou respiratoires etc. L'utilisation de cultures cellulaires ou d'explants n'est pas informative car elle ne permet pas de reproduire les interactions complexes entre le cerveau, les vaisseaux sanguins, le système immunitaire et les organes périphériques. Il y a donc un besoin de modèles animaux permettant de reproduire cette pathologie et de tester de nouveaux médicaments susceptibles d'améliorer la récupération des patients. Notre équipe a récemment mis au point un modèle de TC sévère chez le rat qui consiste à appliquer une onde de choc de 3.8-4 atm durant 20 ms sur la dure mère. Comme en clinique, ce choc provoque un arrêt respiratoire qui nécessite une ventilation mécanique et une perte de conscience de plus de 30 min. En appliquant l'onde de choc de la même manière chez tous les animaux, il est possible d'obtenir des lésions

neurologiques très reproductibles, ce qui est un atout inestimable pour la recherche. Ce projet visera dans un premier temps à raffiner ce modèle en introduisant un appareillage moins encombrant pour faciliter la mise en œuvre du TC sur plusieurs sites expérimentaux comme les plates-formes d'imagerie ou de comportement. Ce projet visera ensuite à mieux comprendre les mécanismes mis en jeu après TC sévère et contribuant à la mort des cellules nerveuses au cours des premiers jours suivant l'accident. Notamment, les mécanismes dits « excitotoxiques » seront étudiés ici, avec l'implication de neurotransmetteurs comme le glutamate, la D-sérine et le monoxyde d'azote (NO). L'ensemble du projet se déroulera chez des rats anesthésiés sans réveil. En plus de l'anesthésie, les animaux sont traités contre la douleur avec des analgésiques puissants : buprénorphine, lidocaïne et ropivacaïne. Le nombre d'animaux utilisés au cours du projet est maintenu à un niveau minimal permettant des analyses statistiques nécessaires à l'établissement de conclusions fiables. L'ensemble du projet se déroulera sur une période de cinq ans, et impliquera 75 rats adultes mâles et femelles.

10255 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 proposée 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 dont l'efficacité thérapeutique a été montrée dans une précédente étude. Pour une approche thérapeutique, les molécules sont couplées au Lutétium-177, un émetteur de particules beta-, bien adapté à la radiothérapie interne. Cependant, une captation non négligeable de ces molécules a été observée dans les ovaires lors des études précédentes. L'un des objectifs de la présente étude est donc d'évaluer l'effet potentiellement toxique de ces 2 RIV avec un fort potentiel thérapeutique, sur les ovaires de souris.

Le risque d'infertilité à la suite du traitement d'un cancer est fréquent et il dépend essentiellement du type de traitement (chimiothérapie, radiothérapie externe ou RIV) et des doses et molécules utilisées. Une molécule a montré un effet protecteur, lorsqu'il est administré pendant 15 jours avant un traitement de chimiothérapie chez des souris CD1 saines. Le second objectif de notre étude est de tester l'effet potentiellement protecteur de cette molécule sur les 2 traitements de RIV développés. L'étude envisagée sera donc réalisée chez la souris saine, avec ou sans prétraitement, et injectée avec l'une ou l'autre RIV à différentes doses.

Au total, 78 souris au maximum seront incluses dans ce protocole. Tout au long du protocole in vivo, nous respecterons la règle des 3R (Remplacer, Réduire et Raffiner). Nous limiterons le projet aux seules expériences considérées comme indispensables chez l'animal. Ainsi, le nombre minimum d'animaux permettant le recueil de données statistiquement exploitables sera utilisé. Les souris seront hébergées par groupe, avec enrichissement du milieu de vie. Un suivi quotidien de leur bien-être sera réalisé, tout particulièrement après l'injection de la RIV.

10256 L'obésité est une maladie multifactorielle. En dehors d'une origine génétique ou développée suite à des excès alimentaires associés à un défaut d'activité physique, des causes environnementales ont été récemment impliquées après des expérimentations sur l'animal ou des études épidémiologiques chez l'Homme. Ainsi ces produits chimiques initialement mis en évidence pour leurs propriétés de perturbateurs endocriniens sont également capables de perturbations métaboliques comme par exemple, favoriser l'obésité ou l'installation d'un diabète.

La présence d'un mélange très faiblement dosé de 4 polluants : une dioxine, un PCB (polychlorobiphényle), Bisphénol A, un phtalate, dans une alimentation hypercalorique proposée à des souris tout au long de la vie, provoque dans leur descendance (génération F1) des désordres métaboliques différents selon le sexe, le contexte nutritionnel et la durée du traitement. Les objectifs de ce projet sont d'explorer plus à fond les mécanismes impliqués dans l'adaptation à une exposition aux polluants, en étudiant l'intestin en plus du foie, 2 organes impliqués dans la détoxification. Les tissus adipeux seront également étudiés. Les euthanasies seront faites selon des techniques approuvées.

Le but du modèle consistant à exposer toute la vie (donc en partie via les mères) des souris à des polluants en mélange à doses faibles via une alimentation riche ou normo-calorique, est d'utiliser des modes d'exposition au plus près de la réalité en santé humaine. Selon les résultats, le message en matière de politique de prévention de Santé Publique pourrait cibler ou non des populations définies (ex : en surpoids ou obèses, femmes enceintes...).

Dans le respect de la règle des 3R, le nombre de souris utilisées est limité autant que faire se peut en considérant des nombres moyens d'animaux par portée de sorte à avoir un nombre d'échantillons en fin d'expérience permettant l'obtention de résultats statistiquement exploitables. La complexité des régulations métaboliques reposant sur des interactions entre organes et notamment foie, tissu adipeux et intestin requiert de travailler sur l'animal. Cette utilisation est maximisée puisque l'ensemble des tissus métaboliques seront prélevés et que des tests métaboliques seront également réalisés (tests impossibles en cultures cellulaires). En même temps, une attention particulière sera développée tout au long des protocoles pour limiter la souffrance des souris selon des techniques approuvées. A noter que les souris nourries avec le régime riche deviennent obèses mais n'ont pas de problème de mobilité ou de fertilité. De plus aux doses utilisées, les polluants ne provoquent pas de repro-toxicité.

Pour l'étude proposée, 280 animaux environ seront utilisés sur les 5 ans.

10257 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 digestif », 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 peut être variable, permet d'adapter au mieux les apports aux besoins des animaux et de réduire les rejets dans l'environnement. En fait, la présence d'éléments nutritifs non digérés et en particulier, carbohydrates et protéines, entraîne une augmentation des fermentations des déjections et une dégradation des conditions sanitaires de l'élevage. In fine, ces rejets se retrouvent en tant que polluants dans l'environnement (sol, air, eau).

Pour ce projet, 36 coqs adultes permettent la réalisation de bilans digestifs pendant 4 ans (un lot de 18 coqs tous les deux ans). Ils sont élevés dans une salle équipée de cages individuelles, avec perchoir, nourris et abreuvés à volonté.

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

La règle des 3 R est respectée comme suit :

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. Le coq est un modèle utilisé classiquement pour cela. Les valeurs obtenues sur coqs permettent d'estimer la valeur nutritionnelle chez les animaux en croissance et la poule pondeuse, au moins de manière comparative.

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 1 à 2 % de valeur énergétique (sur la base de nos propres résultats), niveau suffisant d'un point de vue biologique et zootechnique. L'adaptation facile du coq à l'environnement expérimental et l'homogénéité des réponses entre individus, permet de générer un grand nombre de données avec un nombre réduit d'animaux.

L'utilisation du même lot d'animaux pour évaluer plusieurs aliments répartis sur les 2 ans réduit d'autant le nombre d'animaux utilisé.

Raffinement : Les animaux ont une perception visuelle, auditive et olfactive des congénères (cages accolées et grillagées). La surveillance journalière, la manipulation des mangeoires et des abreuvoirs, permettent une habituation des animaux à la présence humaine. Un perchoir est installé dans chaque cage. Les cages disposent d'un fond coulissant permettant la réduction de surface pour les bilans, sans manipulation stressante pour les animaux.

10258 Au cours du siècle dernier, les régimes alimentaires ont drastiquement évolué entraînant notamment une carence en acides gras polyinsaturés (AGPI) n-3, également connus sous le nom d'oméga-3, au profit des oméga-6. Or, les oméga-3 sont nécessaires pour le bon fonctionnement cérébral et la santé mentale. Ainsi, des études cliniques et précliniques suggèrent qu'une carence en oméga-3 constitue un facteur de risque important pour le développement de troubles neuropsychiatriques comme les troubles de l'humeur. Par exemple, les patients dépressifs présentent des taux d'oméga-3 dans le sang et le cerveau qui sont plus faibles que dans le reste de la population. Notre projet s'inscrit dans ce contexte puisqu'il vise à comprendre quelle sont les conséquences de régimes dont les compositions en oméga-3 ont été altérées sur le métabolisme lipidique. De plus, nous savons à présent qu'il y a une relation directe entre apports en oméga-3 et quantités de DHA (acide docosahexaénoïque) dans les membranes cellulaires. Enfin, une étude a également montré qu'une partie du DHA peut être utilisée pour la synthèse de DHEA, un composé structurellement identique au DHA mais présentant un groupement chimique différent. In fine, la production de DHEA serait à l'origine de mécanismes plastiques dans les neurones, qui constitue un des axes de recherche de notre laboratoire.

Hypothèse de travail

Dans ce projet, nous faisons l'hypothèse que des taux augmentés ou appauvris en oméga-3 vont directement altérer la production de DHEA dans les cellules. Nous mesurerons ainsi les quantités d'oméga-3, de DHEA, de DHA et des enzymes impliquées dans le métabolisme lipidique suite à 8 semaines de régime enrichis, appauvris ou balancés en oméga-3. Ce travail se fera uniquement sur des souris mâles C57Bl6/j et les régimes commenceront à partir du jour du sevrage des animaux (21^{ème} jour après la naissance).

L'ensemble des procédures proposées est en conformité avec les directives européennes 2010/63/UE et les directives françaises, dans le respect des nouveaux standards de soin et de bien-être des animaux (règle des 3Rs), appliqués dans notre équipe de recherche :

-le Raffinement consiste en une régulation de la température, de l'hygrométrie, raffinement de l'enrichissement des cages pour améliorer leur hébergement (mise à disposition de maison en carton et de morceaux de coton, favorisant ainsi la construction d'un nid ainsi que le jeu, indispensable à la sociabilisation des animaux). Les animaux utilisés dans l'étude seront observés tous les jours de la semaine et pesés 1 fois par semaine. Si un animal apparaît malade ou avoir des douleurs, il sera immédiatement isolé, surveillé et des soins adaptés lui seront administrés.

-le Remplacement est impossible car ce projet ne pourrait être réalisé sans l'utilisation de modèles animaux, puisqu'il s'intéresse à des dimensions de régimes alimentaires ainsi qu'à l'évaluation de la fonction et la transmission cérébrale, non modélisables sur des modèles in vitro ou in silico.

-la Réduction consistait à déterminer combien d'animaux seront nécessaires à la réalisation de ce projet. Statistiquement, nous avons calculés que 36 souris seront nécessaires (pour chaque régime alimentaire) afin d'obtenir à la fois des groupes homogènes, mais également afin d'obtenir une puissance statistique suffisante au sein de chaque groupe. Ainsi, nous utiliserons un total de 36 souris mâles C57Bl6/j, qui seront soumises dès leur sevrage (21^{ème} jour après la naissance) à 8 semaines de régimes équilibrés (1/3 des animaux), supplémentés (1/3 des animaux) ou déficients en oméga-3 (dernier 1/3 restant).

10259 L'obésité est un problème socio-économique majeur de notre société avec près de la moitié de la population française en surpoids ou obèse. Cette pathologie est causée par un déséquilibre de la balance énergétique correspondant à des apports alimentaires excessifs associés à une faible dépense énergétique engendrant ainsi une prise de masse grasse importante et un état

inflammatoire chronique. L'obésité peut engendrer des complications physiopathologiques tel que le diabète de type 2 (TD2), mais aussi des conséquences cardiovasculaires et respiratoires. Les causes de l'obésité sont diverses. De nombreux facteurs y contribuent comme la prédisposition génétique, l'environnement, le statut hormonal de l'individu, le manque d'activité physique, la sédentarité, l'alimentation mais aussi, directement ou indirectement, le microbiote. Outre la prise en charge chirurgicale et médicamenteuse qui correspondent à des mesures dites « ultimes », la mise en place de conseils et mesures hygiéno-diététiques (incluant des régimes hypo-énergétiques et/ou une augmentation du niveau d'activité physique) reste à privilégier.

Le microbiote constitue un écosystème complexe qui est aujourd'hui reconnu comme étant impliqué dans la santé de l'homme. Le déséquilibre ainsi que la diminution de la richesse et de la diversité microbienne intestinale, peuvent favoriser l'apparition ou le maintien d'une obésité. De ce fait, cela devient une cible thérapeutique intéressante dans la lutte contre le surpoids. L'activité physique et une alimentation riche en acides gras polyinsaturés n-3 (AGPI n-3) acide alpha-linolénique (ALA) sont également des pistes pour tenter de restaurer un équilibre de la composition microbienne intestinale. La mise en place d'une activité physique régulière ou d'une complémentation nutritionnelle spécifique pourrait ainsi être envisagée dans un contexte d'obésité. Outre son effet sur la composition corporelle et sur l'inflammation et le métabolisme, l'activité physique a potentiellement un impact sur la balance microbienne en faveur d'un meilleur équilibre de la balance bactéries bénéfiques et bactéries pathogènes. D'autres études ont montré des effets positifs d'un entraînement intermittent de haute intensité (HIIT) sur la composition corporelle et le microbiote intestinal. Sur un plan nutritionnel, les AGPI n-3, synthétisés par les végétaux terrestres ou marins, peuvent se retrouver dans des huiles végétales ou dans les tissus des animaux qui les auront consommés (Huile et Graine de lin, huile de noix et de colza, poissons gras, algues, herbe ...) et agir sur le microbiote. L'huile de lin est riche en acide alpha-linolénique (ALA), précurseur des AGPI n-3, avec un ratio AGPI n-6/AGPI n-3 faible. Une supplémentation en huile de lin riche en AGPI n-3 pourrait prévenir le déséquilibre du microbiote provoqué par l'obésité et l'inflammation intestinale. Ainsi, si indépendamment, l'activité physique (dont l'HIIT) et les AGPI n-3 ont déjà démontré des effets bénéfiques sur la santé dans un contexte d'obésité, la question se pose de savoir si un apport en AGPI n-3 associé à un programme d'HIIT pourrait, par interaction, augmenter les effets bénéfiques sur l'inflammation ainsi que sur la composition corporelle en tentant de rééquilibrer le microbiote.

Pour cette étude, 60 rats Wistar âgés de 8 semaines suivront un régime riche en lipides pendant 16 semaines dans des cages individuelles, puis seront répartis en différents groupes et certains suivront, pendant 12 semaines, un programme d'activité physique (HIIT) et/ou un régime supplémenté en huile de lin riche en ALA intégré directement dans leur alimentation. Nous attendons de cette étude une meilleure compréhension des processus menant à une diminution de l'inflammation chronique suite à un programme d'activité physique associé à une alimentation supplémentée en ALA.

Dans sa globalité, le projet de recherche proposé permettra d'identifier les moyens de faire évoluer les comportements vers des pratiques saines et durables et mettra à disposition des éléments pour orienter les politiques publiques et privées dans le but d'améliorer à la fois la santé et le bien-être des populations. Il permettra également d'apporter de nouveaux éléments visant à terme à déterminer l'impact de l'environnement et des pratiques sociétales sur le microbiote intestinal et sur la santé humaine et à proposer des alternatives inédites aux traitements biologiques.

Le protocole proposé s'inscrit dans le respect de la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner) pour l'expérimentation animale. Afin de comprendre les mécanismes adaptatifs au complément et/ou l'entraînement, nous ne pouvons pas remplacer cette expérimentation animale par une expérimentation in vitro, ex vivo ou in-silico. Le nombre d'animaux par lot est toutefois limité au maximum (à partir d'un test de puissance en lien avec la littérature. Les rats (n=60) seront mis en cage individuelle dans un environnement enrichi avec une balle en inox dès leur arrivée. Bien que l'isolement induise un stress sur l'animal, il est nécessaire pour cette étude pour le suivi hebdomadaire de la prise alimentaire. Toutefois, les cages seront transparentes et collées les unes aux autres ainsi elles permettront aux animaux de se voir et se sentir.

Aucune procédure très douloureuse n'est prévue. Toutefois, si besoin, nous mettrons en œuvre des méthodes permettant de limiter au maximum toute éventuelle souffrance de nos animaux (mise en place de points limites, utilisation de cages adaptées et surveillance quotidienne des animaux afin de prendre rapidement des décisions de soins ou d'exclusion d'animaux en souffrance).

10260 Le monoxyde d'azote (NO) et le monoxyde de carbone (CO) sont des dérivés oxygénés présents dans le cerveau et dont les rôles sont encore mal connus. Le monoxyde d'azote est un radical libre impliqué dans la plasticité synaptique, la mémoire, la vasodilatation des vaisseaux sanguins. Il peut être aussi à l'origine de processus neurotoxiques impliqués dans certaines maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer ou encore dans les lésions neurologiques produites par les agressions cérébrales aiguës comme les accidents vasculaires cérébraux. Le monoxyde de carbone peut lui aussi être produit par les neurones et partage plusieurs fonctions physiologiques avec le NO, dont la vasodilatation et la mémoire. Récemment, notre laboratoire a mis au point un microcapteur électrochimique permettant de détecter le NO dans le cerveau d'animaux de laboratoire. Par une approche *in vitro* (n'utilisant pas d'animaux vivants), nous avons récemment développé une méthode plus sensible utilisant deux électrodes couplées, permettant de détecter des concentrations plus faibles de NO. De plus, cette méthode permet aussi en principe de détecter le CO. L'ensemble de nos résultats *in vitro* indique que cette méthode peut permettre de détecter le NO et le CO *in vivo* dans le cerveau d'animaux de laboratoire. Ce projet consistera à implanter nos capteurs dans le cortex de rats anesthésiés et de stimuler le tissu cérébral par une vague de dépolarisation ou une électrode de stimulation. Ces stimuli induiront la libération d'une faible quantité de NO qui est proche de la limite de détection des techniques conventionnelles. Nous faisons l'hypothèse que notre nouvelle technique permettra de mieux mettre en évidence cette libération grâce à sa meilleure sensibilité. De plus, nous testerons la possibilité qu'une libération de CO soit aussi induite par ce stimulus. Ce projet utilisera un total de 80 rats mâles et femelles sur cinq ans. Le nombre d'animaux est réduit au minimum pour permettre une interprétation statistique des résultats. L'ensemble des expérimentations décrites dans ce projet sera effectué sous anesthésie générale sans réveil avec analgésie générale et locale au niveau du scalp, elles ont été raffinées pour minimiser la souffrance des animaux. De plus, les expérimentations *in vitro* et *ex vivo* réduisant le recours aux animaux vivants ont déjà été réalisées et continueront à être mises en œuvre pour remplacer l'expérimentation *in vivo* dès que possible. L'ensemble de ce projet permettra de mieux comprendre les conditions de libération du CO dans le cerveau, et notamment, d'identifier les stimuli permettant la libération de ce neurotransmetteur ainsi que les concentrations atteintes dans le cerveau. Ce projet utilisera des animaux sous anesthésie gazeuse, sous analgésie et sans réveil, ce qui permettra d'atteindre nos résultats sans nuire au bien-être des animaux.

10261 1. Objectif scientifique du projet

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez la femme. Bien que les programmes de prévention et de dépistage, ainsi que les traitements ciblant spécifiquement les cellules cancéreuses ont permis de réduire la mortalité liée au cancer, le cancer du sein reste la première cause de décès chez la femme, avec 12 665 cas en 2015 (EUCAN, iarc). Sans amélioration dans la prise en charge, le taux de mortalité lié au cancer du sein aura augmenté de 17% en 2030. L'identification de nouvelles cibles thérapeutiques est donc primordiale pour faire face à ce problème majeur de santé publique.

TLR3 est un récepteur de l'immunité, exprimé par des cellules immunitaires et épithéliales. De manière très intéressante, le ciblage thérapeutique de ce récepteur permet d'entraîner la mort des cellules tumorales exprimant le récepteur, sans affecter les cellules normales. Ceci 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. La preuve de concept *in vitro* de l'effet pro-apoptotique de ces molécules sur des cellules tumorales a été apporté *in vitro*. Le but de ce projet est de prouver l'efficacité de ces ligands dans un modèle préclinique murin de tumeur mammaires spontanées.

2- Retombées attendues dans le domaine de la cancérologie

Le projet a pour but d'identifier de nouveaux ligands antitumoraux, ciblant les cancers épithéliaux TLR3. Ces résultats s'inscrivent dans le cadre du développement d'une application thérapeutique utilisable chez les patients.

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

Seul un modèle murin permettra d'étudier l'efficacité de ligands de TLR3 au cours des différentes étapes de la progression tumorale. De plus, les approches de déplétion par anticorps de cellule immunitaires ne sont pas possibles chez l'homme. De ce fait, la validation de TLR3 comme cible thérapeutique se verra d'abord testée chez la souris comme modèle préclinique avant de les appliquer à l'homme.

La règle des 3R (réduire, raffiner, remplacer) sera respectée ; Réduction du nombre d'animaux, sans mettre en péril une interprétation statistique des résultats. Une définition précise des points limites et une surveillance adaptée des animaux, minimum 2 fois par semaine, permettra d'éviter la souffrance des animaux. De plus, tous les gestes pouvant provoquer un stress ou de l'anxiété chez la souris, seront réalisés sous anesthésie. Ces procédures ne requièrent pas l'usage d'analgésique.

Raffinement : lors de la réalisation des protocoles, le maximum d'informations et de prélèvement seront récoltés afin de restreindre l'utilisation de l'animal. En effet, de nombreuses analyses in vitro seront réalisées sur les différents prélèvements pour documenter et obtenir le maximum d'information sur ce modèle préclinique.

4- Nombre total d'animaux inclus dans ce projet

Au total, 360 souris seront incluses dans ce projet pendant les 3 ans à venir.

10262 Le système musculaire nous permet de respirer, marcher, manger, sourire. Les muscles squelettiques s'atrophient au cours du vieillissement, lors d'hospitalisation prolongée, au cours du cancer, et dans de nombreuses myopathies d'origine génétique. C'est le cas par exemple de la myopathie de Duchenne où les fibres musculaires sont en perpétuel renouvellement. Lors de ce renouvellement, les cellules souches du muscle, appelées cellules satellites (CS) sont recrutées pour tenter de réparer la fibre. Lors d'exercices intenses les fibres musculaires peuvent aussi se casser, et là aussi, les CS réparent les fibres endommagées. La compréhension des mécanismes qui président à la formation des CS et ensuite chez l'adulte à leur maintien est fondamentale pour tenter un jour d'intervenir sur ces cellules en modulant leurs propriétés. Il existe plusieurs types de fibres musculaires aux propriétés de contraction et d'endurance lors de l'effort bien distinctes et qui sont plus ou moins vulnérables dans différents types de pathologie ou au cours du vieillissement. La plupart de ces situations ne peuvent pas être reproduites in vitro ou ex vivo. Mais nous disposons de différents modèles de souris génétiquement modifiées permettant d'étudier les mécanismes qui président à l'engagement des cellules pluripotentes dans la voie myogénique, la genèse des cellules souches musculaires, la spécialisation des différents types de fibres musculaires squelettiques ainsi que l'implication de leurs CS.

512 souris sont nécessaires pour mener à bien notre projet et permettre l'analyse statistique des différences observées. Différents types de lésion musculaire seront induits sous anesthésie générale à des souris présentant différents génotypes. Pour chaque protocole nous comparerons ces animaux à différents temps au cours du processus de régénération (4 jours à 30 jours maximum après la lésion) pour comprendre comment se met en place ce mécanisme.

Pour respecter la règle des 3R, le nombre d'animaux sera réduit au minimum. Les animaux seront surveillés quotidiennement pendant toute la durée de l'expérience afin de déceler des signes de douleur. Nous avons défini les variables analysées et la méthode d'évaluation quantitative du point limite au-delà duquel les animaux recevront un analgésique ou seront euthanasiés. Toutes les expériences qui peuvent être menées en culture seront réalisées en remplacement des protocoles sur l'animal, et la mise au point de modèles cellulaires adéquats fait partie intégrante de notre projet. La myofibre a besoin d'être innervée pour être fonctionnelle et les mécanismes de régénération musculaire font appel entre autre au système immunitaire (macrophages) et aux interactions entre la cellule souche et sa myofibre. Le modèle de souris permet d'accéder à tous les acteurs qui contrôlent la physiologie de la myofibre et de ces cellules souches.

En conclusion, les études menées amélioreront nos connaissances sur les propriétés des cellules souches musculaires. Nos études sur la plasticité musculaire devraient aussi nous permettre de mieux comprendre les bases de l'atrophie musculaire préférentielle de certains types de fibres musculaires observée au cours du vieillissement chez l'homme.

10263 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 gonadotropines, 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 pré-traitement 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 pré-traitement 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 totale d'animaux utilisé 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.

10264 Le syndrome de l'intestin irritable (SII, irritable bowel syndrome (IBS) dans la littérature anglo-saxonne), est un trouble fonctionnel intestinal dans lequel des douleurs abdominales sont associées à des ballonnements et des troubles du transit (avec une diarrhée ou une constipation prédominante voire une alternance des 2) et une hypersensibilité viscérale. Si ces différents symptômes ne sont pas spécifiques de l'IBS, ils revêtent dans le cadre de cette pathologie un caractère chronique et récidivant.

Le SII touche indifféremment les hommes et les femmes entre 15 et 65 ans. Sa prévalence en Europe et en Amérique du Nord est estimée à 10-15%. S'il n'est pas associé à un risque accru de développer un cancer ou une maladie inflammatoire chronique intestinale ou un taux de mortalité augmenté, le SII perturbe de manière considérable la vie quotidienne et les activités sociales de bon nombre de patients et engendrent des dépenses de santé considérables.

Les mécanismes mis en jeu dans l'apparition du SII demeurent mal connus et aucun substrat physiopathologique n'a été démontré à ce jour. Il existe une relation fréquente entre les symptômes du SII et des facteurs tels que l'alimentation, le stress et des facteurs psychologiques et infectieux. Une association entre anxiété, dépression et syndrome du côlon irritable a été montrée par plusieurs études. Par ailleurs, le lien possible entre SII et infection ou perturbation de la flore intestinale (qualitative ou quantitative) est appuyé par l'efficacité, chez certains patients, d'antibiotiques ciblant spécifiquement la flore intestinale, notamment la rifaximine.

Il n'existe à ce jour aucune approche standard permettant de soigner de manière simple et définitive le syndrome du côlon irritable dans la mesure où les causes de la maladie peuvent varier d'un individu à l'autre. Il est cependant possible de mettre en place des approches qui permettent de réduire l'intensité des symptômes.

L'utilisation de laxatifs, la consommation de fibres alimentaires ou la prise d'agents anti-diarrhéiques est fréquemment mise en place pour le traitement des troubles du transit. Le loperamide étant par exemple prescrit dans certains cas pour le traitement des diarrhées.

Les douleurs abdominales quant à elles peuvent être réduites chez certains patients par la prise d'antispasmodiques. Des traitements par antibiotiques ont également montré une efficacité sur différents symptômes du SII. Les antidépresseurs sont également utilisés dans le traitement du SII de par leur action sur l'humeur (facteurs psychologiques associés au SII). L'utilisation de certains probiotiques peut également diminuer les douleurs, le ballonnement, et normaliser le transit intestinal chez les patients souffrant de SII.

D'un point de vue thérapeutique, malgré la diversité des stratégies médicamenteuses et non médicamenteuses qui peuvent être mises en place, elles n'apportent pas à ce jour une réponse totalement satisfaisante, leur utilisation peut être accompagnée d'effets secondaires importants et ils ne sont pas efficaces chez tous les patients.

Compte tenu des éléments évoqués plus haut, il apparaît clairement que les efforts engagés pour mettre en place de nouvelles stratégies thérapeutiques permettant de mieux contrôler les différents troubles associés au SII, doivent être poursuivis. Différentes observations mettent cependant en évidence l'implication de facteurs à la fois périphériques (modifications de la flore intestinale, perturbation de la motricité digestive, historiques d'épisodes infectieux, etc...) et centraux (hypersensibilité du tube digestif, influence du stress et de certains états psychologiques) dans l'apparition du SII. Compte tenu de l'interaction étroite entre ces différents systèmes, il est clair que, dans le processus de développement de candidats médicaments, des preuves de concept doivent être obtenues sur animal entier. Dans cette optique, différents modèles animaux ont été développés chez plusieurs espèces. Cependant, le modèle de distension colorectale après sensibilisation chez le rat compte parmi les modèles les plus classiquement utilisés et fait l'objet du présent projet.

Le nombre d'animaux inclus dans ce projet a été déterminé par un calcul de N : 60 par série expérimentale pour un total de 15 séries sur 5 ans, soit 900 animaux. Les animaux feront l'objet d'une observation clinique par un personnel qualifié à reconnaître les signes de souffrance et d'inconfort chez le rat et si le point limite était atteint sur la base d'une grille d'évaluation de la souffrance, le rongeur serait alors euthanasié, sans souffrance, selon les normes éthiques en vigueur.

10265 L'hypertrophie bénigne de la prostate (HBP) est la maladie la plus fréquente de l'homme âgé (90 % d'atteintes histologiques chez les sujets de 80 ans). Au plan clinique, elle se manifeste par des troubles urinaires du bas appareil urinaire. La pathogénèse de l'HBP n'est pas entièrement élucidée. Ce développement débute vers la quatrième décennie pour ne devenir macroscopique que vers la sixième ou septième décennie, c'est-à-dire chez le sujet âgé. Pour ce qui concerne l'épidémiologie, diverses études internationales ont montré des prévalences variées, néanmoins, toutes montrent une augmentation avec l'âge, et des extrêmes de 12 % à 25 % pour des symptômes modérés, et

de 2 % à 6 % pour les symptômes sévères. Les patients ayant une HBP symptomatique qui ne relève ni de la simple surveillance, ni d'un traitement chirurgical, sont candidats à un traitement pharmacologique. Quatre classes thérapeutiques peuvent être utilisées dans le traitement de l'HBP dont la phytothérapie. Toutefois, l'efficacité de ces traitements est assez limitée et en plus associée à de nombreux effets secondaires, à l'exception de la phytothérapie. Il y a donc une forte demande de la part des patients et des urologues pour tester de nouveaux traitements qui soient plus efficaces et ayant très peu d'effets indésirables.

Le but de ce projet est de tester des médicaments déjà connus ainsi que de nouvelles molécules dans un modèle expérimental d'HBP chez la souris. Des souris mâles adultes seront traitées pendant 12 semaines par une combinaison de différentes hormones sexuelles. Plusieurs études ont montré que les souris ayant reçu ce type de traitement chronique sont caractérisées par une hypertrophie prostatique importante, une obstruction urétrale, une rétention urinaire et une augmentation de la fréquence de mictions. Ce modèle expérimental mime donc la pathologie humaine à la différence d'autres modèles couramment utilisés, en particulier chez le rat, le lapin ou le chien. Afin d'étudier les effets in vivo des candidats médicaments pour l'HBP ce modèle devrait être utilisé de préférence. Afin de tester les dysfonctions urinaires secondaires à l'hypertrophie prostatique, à la fin du traitement hormonal, les souris seront placées dans des cages métaboliques pendant 24 heures. Ces cages sont conçues de façon à laisser passer les urines en bloquant totalement les fèces. Cela nous permettra de tester l'effet des candidats médicaments sur les mictions pendant la phase active (la nuit) et la phase de repos (le jour). Ce système non-invasif de test de la fonction de la vessie urinaire représente un gros avantage par rapport aux protocoles expérimentaux utilisés couramment. Notre protocole expérimental respecte donc le principe des 3R, à savoir la réduction du nombre d'animaux (le design de l'étude étant un plan d'expérience contrôlé en mesures répétées, le nombre d'animaux est réduit à 17 animaux par groupe, et le nombre de groupes sera en fonction du nombre de molécules à tester), le remplacement (les tests in vitro n'étant pas probants, l'utilisation des souris est indispensable pour valider cette étude; par contre la souris remplace le chien comme modèle expérimental) et le raffinement car pour l'étude la fréquence mictionnelle, nous utiliserons un modèle non-invasif, qui réduit fortement la souffrance animale. Le suivi quotidien des animaux permettra d'identifier tout signe de douleur ou de souffrance nécessitant une intervention la plus précoce possible. Les souris seront pesées 2 fois par semaine. La manipulation des souris et le gavage seront effectués exclusivement par du personnel ayant la formation nécessaire. Un enrichissement du milieu dans les cages sera mis en place. Lors des expériences dans les cages métaboliques, afin de réduire le stress, les souris seront en contact visuel et olfactif entre elles.

Ce projet nécessite l'utilisation de 2040 souris sur 5 ans.

10266 Une des caractéristiques liées à l'obésité est l'augmentation des graisses dans la circulation sanguine. Les graisses sont stockées de manière très importante dans le tissu adipeux où elles sont dégradées en acides gras ce qui permet 1/ la production de chaleur, 2/ la libération des acides gras dans la circulation sanguine qui sont ensuite consommés par les autres cellules de l'organisme à des fins énergétiques. Ainsi un défaut de combustion et/ou de consommation de ces graisses par les tissus périphériques conduit à une augmentation des graisses dans le sang et à une mauvaise thermorégulation. La compréhension des mécanismes de consommation de ces graisses représente donc un enjeu important.

Nous étudierons une protéine impliquée dans le métabolisme mais dont le rôle dans la dégradation de ces graisses au niveau du foie n'est pas très bien caractérisé. Pour cela, nous utiliserons des souris génétiquement modifiées qui n'expriment pas cette protéine uniquement dans le foie.

Dans un premier temps, nous traiterons des souris avec une molécule pharmacologique qui induit la libération d'acides gras du tissu adipeux vers la circulation conduisant à l'augmentation des graisses circulantes. La molécule sera administrée une fois par gavage oral. Nous réaliserons ces expériences sur 4 lots de souris : 2 lots de 8 souris qui ne possèdent pas la protéine au niveau du foie et qui sont traitées ou non avec la molécule pharmacologique, et 2 lots de 8 souris de type sauvage, traitées ou non avec la molécule pharmacologique.

Dans une deuxième série d'expérience, les animaux seront exposés au froid (4°C) pendant 5h entraînant comme précédemment une libération d'acides gras du tissu adipeux vers la circulation mais aussi une production de chaleur. Les souris seront placées dans une pièce à 4°C dans des cages individuelles afin d'éviter le réchauffement par contact. Leur température corporelle sera mesurée toutes les heures à l'aide d'un thermomètre avec sonde rectale spécifique pour les petits rongeurs. Nous réaliserons ces expériences sur 4 lots de souris : 2 lots de 8 souris qui ne possèdent pas la protéine au niveau du foie et qui sont exposées ou non au froid, et 2 lots de 8 souris de type sauvage, exposées ou non au froid.

En fin de protocole (6h après l'administration de la molécule pharmacologique ou après 5h d'exposition au froid), une prise de sang sera effectuée à la veine faciale sub-mandibulaire dans le but de doser les lipides et hormones circulants dans le plasma et divers paramètres sanguins (glycémie, cétonémie à l'aide de bandelettes glycémiqes et cétonémiques). Immédiatement après, les animaux seront euthanasiés et les organes (foie, tissu adipeux blanc et tissu adipeux brun) leurs seront prélevés afin de conduire des études d'expression de gènes impliqués dans les voies métaboliques. Cette expérience permettra :

- de mettre en évidence l'implication d'une protéine du foie dans la prise en charge des graisses provenant du tissu adipeux et dans le processus de thermorégulation.

- d'étudier le dialogue entre différents organes : le foie et les tissus adipeux.

Pour ces expériences, nous utiliserons donc au total 64 animaux. Ceci nous permet de travailler sur des lots de 8 souris par condition. Basé sur les données de la littérature et des expériences antérieures du laboratoire, ce nombre d'animaux est le nombre minimum nécessaire mais suffisant afin d'obtenir des résultats exploitables. L'utilisation de l'animal entier est indispensable car le projet porte sur le dialogue entre plusieurs organes dans la régulation des voies métaboliques. De plus, la souris est un modèle de choix pour nos expériences car adapté aux mécanismes que nous étudions et qui nous permet d'invalider une protéine d'intérêt dans un organe en particulier. Ainsi nous ne pouvons pas utiliser de méthodes alternatives de remplacement pour cette étude. Nous veillerons au bien-être des animaux tout au long des expérimentations en leur assurant les meilleures conditions d'hébergement, dans un environnement contrôlé, une surveillance par le personnel soignant et des enrichissements du milieu (cabanos inox et ouate dans les cages). Ces deux procédures permettent d'éviter l'utilisation d'un régime restrictif sur le long terme qui entraînerait une chute de poids importante chez les animaux pour mimer les mêmes effets. Lors de l'exposition au froid, la température corporelle des animaux sera mesurée toutes les heures et si un animal présente une hypothermie sévère (températures corporelle inférieure à 30 degrés) il sera aussitôt éliminé de la procédure et réchauffé (lampe chauffante).

L'utilisation de l'animal, ici la souris, est nécessaire à ce projet qui permettra de mieux comprendre les mécanismes de consommation des graisses circulantes, processus majeur dans le contexte d'obésité.

10267 Notre projet s'inscrit dans le cadre d'une formation d'utilisateurs à des gestes chirurgicaux, se déroulant sur 4 jours.

Il s'agit d'une formation qui est complémentaire à la formation réglementaire concepteur ou praticien et à la formation d'initiation à la chirurgie.

Nous souhaitons proposer, chaque année, à 12 participants (chercheurs, ingénieurs, techniciens, étudiants.) de se former à 12 techniques chirurgicales de pointe sur la souris. Il s'agit de 12 techniques chirurgicales qui sont très souvent utilisées pour répondre à des questions scientifiques dans des domaines variés (oncologie, métabolisme, étude sur la reproduction.). Il s'agit des techniques suivantes : castration, vasectomie, néphrectomie totale et partielle, greffe d'implant dans la capsule sous-rénale, surrénalectomie, cathétérisme de la veine jugulaire et de l'artère carotide, ovariectomie, transplantation ovarienne, splénectomie, exérèse du thymus. La réalisation de cette formation nécessite 24 souris par participant. Une session de formation a lieu chaque année. Le nombre d'animaux utilisés sera donc au maximum de 1440 souris sur 5 ans. En plus des procédures chirurgicales, les sujets abordés dans la formation comprennent les méthodes d'analyses biologiques de la souris (injections, gavage, prélèvements sanguins, identification de la souris, euthanasie.), l'anatomie de la souris, les techniques d'asepsie, les sutures et l'utilisation du

microscope, la prise en charge des animaux en période post-opératoire (suivi post-opératoire, définition des points limites, prise en charge de la douleur).

Pour réduire le nombre d'animaux selon la règle des 3R, nous utilisons, pour ce projet de formation, uniquement des animaux issus de la zone d'élevage d'un de nos établissements et qui sont destinés à une euthanasie pour mauvais génotype. En effet, dans une portée de souris hétérozygotes en accouplement, un certain nombre de souris est euthanasié car leurs génotypes n'entrent pas dans l'étude scientifique du chercheur.

Dans ce projet de formation, il s'agit donc d'une récupération des animaux d'élevage de mauvais génotype à des fins de formation scientifique. Les souris transgéniques, conservées pour cette formation, ne présentent pas de phénotype dommageable et aucun phénotype particulier visible.

Pour apprendre à réaliser des gestes chirurgicaux précis, il n'existe aujourd'hui aucun modèle non vivant qui pourrait mimer le modèle animal vivant. Nous n'avons donc pas la possibilité de remplacer le modèle vivant utilisé pour cette formation chirurgicale.

En terme de raffinement, les souris sont hébergées par 5 au maximum dans des cages sur des portoirs ventilés. Elles ont constamment accès à de la nourriture et de l'eau. Pour que les souris puissent réaliser un nid, nous ajoutons des morceaux de coton ou de papier kraft. Les souris sont surveillées quotidiennement par le personnel affecté aux soins des animaux. Pour réduire la douleur, la souffrance et l'angoisse lors des procédures expérimentales de chirurgie, les souris sont anesthésiées par un mélange kétamine/xylazine. Comme toutes les procédures décrites dans ce projet sont toutes des procédures sans réveil, les euthanasies sont effectuées sous anesthésie.

10268 Les maladies du système nerveux (sclérose latérale amyotrophique (SLA), 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.

La SLA est une maladie extrêmement invalidante et d'évolution rapide, caractérisée par une dégénération des motoneurones de la colonne vertébrale qui conduit à une paralysie progressive fatale. Elle est due à une mutation (anomalie de l'ADN) qui entraîne une mort neuronale, touchant principalement le cortex et les motoneurones de la moelle épinière responsables des mouvements. Notre projet a pour but de développer une approche thérapeutique basée sur une thérapie génique qui consiste en l'administration d'un gène thérapeutique confidentiel (impliqué dans le métabolisme du cholestérol) au moyen d'un vecteur adéno-associé (AAV) par injection intraveineuse ou directement dans le cerveau. Le bénéfice thérapeutique attendu est une amélioration et surtout une préservation des motoneurones dans la moelle épinière et ainsi une amélioration des capacités motrices.

Remplacement : Pour le réaliser, nous souhaitons utiliser un modèle animal (souris), car aucun modèle in vitro ou de culture cellulaire ne permet aujourd'hui d'étudier les symptômes de perte de la locomotion typique 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. Pour ce faire, nous utiliserons au minimum 2 à 3 modèles de SLA déjà décrit ou en cours de caractérisation par des collaborateurs.

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 pour le groupe malade non traités. 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. Ils ont également montré que l'étude de groupes de 12 animaux permettait d'obtenir des résultats statistiquement significatifs. Ainsi, dans ce projet, nous prévoyons un total de 720 souris réparties en trois groupes et deux types d'injections (intracérébrales ou intraveineux). De plus, un maximum d'analyses sera réalisé sur les cerveaux et la moelle épinière prélevés pour éviter des doublons des procédures expérimentales.

Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie ont été définis et validés par une équipe vétérinaire. L'application de critères d'arrêts standards en élevage et le suivi quotidien des animaux hébergés en groupe permettent de garantir le bien-être des animaux.

10269 La polyarthrite rhumatoïde (PR) est une maladie chronique, inflammatoire touchant 0.3% de la population française (250.000 patients en France). Cette pathologie entraîne des douleurs autant lorsque l'articulation est au repos que lorsque le patient se sert de celle-ci. Les causes sont inconnues : facteurs génétiques, facteurs environnementaux (fumer augmente le risque de développer une PR) ou existence d'autres pathologies comme le psoriasis au cours duquel les patients accumulent inflammation de la peau et des articulations. La PR est une maladie qui réduit non seulement la qualité de vie mais également l'espérance de vie. Les traitements actuels peuvent permettre une rémission chez une minorité des patients alors qu'ils sont transitoirement efficaces voir inefficaces chez d'autres patients. Il est donc nécessaire de développer d'autres approches thérapeutiques.

Les cellules souches constituent un espoir dans un grand nombre de pathologies par leur capacité de régénération et de renouvellement. Parmi elles, les cellules MUSE, des cellules souches pluripotentes présentes dans la peau et la moelle osseuse des adultes, sont particulièrement résistantes au stress, ont des capacités immunomodulatrices et sont capables enfin de migrer vers les sites inflammatoires. Ces caractéristiques en font des candidates de choix en thérapie cellulaires des maladies inflammatoires chroniques comme la PR. Ce projet s'inscrit dans ce contexte et a pour objectif d'évaluer le potentiel thérapeutique des cellules MUSE dans des modèles d'inflammation chez la souris.

L'utilisation des souris dans cette étude se fera en accord avec la règle des 3R. Les mécanismes que nous souhaitons étudier nécessitent d'avoir un système immunitaire complet et proche de celui de l'homme. La souris est donc le modèle le plus adapté à cette étude. Le nombre d'animaux utilisés sera réduit au maximum afin de permettre des analyses statistiques solides. Des points limites destinés à limiter l'inconfort et la douleur des souris seront mis en place dans chaque expérience et tous les animaux seront pesés et leur comportement surveillé afin de veiller à leur bien-être. Ce projet de recherche nécessitera l'utilisation de 360 souris au maximum, sur 3 ans.

10270 Des études récentes, notamment génétiques, ont mis en évidence l'implication du système immunitaire dans le développement de la maladie d'Alzheimer. Des molécules pro-inflammatoires, les chimiokines sont présentes chez les patients atteints de maladie d'Alzheimer et des études précliniques ont montré que ce sont des cibles thérapeutiques pertinentes dans le traitement de la maladie d'Alzheimer. Des médicaments ciblant ces molécules inflammatoires ont déjà été développés et approuvés pour le traitement d'infection virale et pourrait être repositionnés pour la maladie d'Alzheimer, permettant une évaluation en phase clinique plus rapide. Ce programme de recherche propose d'évaluer l'efficacité thérapeutique de ce médicament anti-inflammatoire dans des modèles murins de maladie d'Alzheimer.

Nous avons suivi la règle des 3R en introduisant des points limites à notre protocole. En revanche, et à notre connaissance après une recherche dans plusieurs bases de données de la littérature scientifique, il n'y a pas d'alternative à l'utilisation de modèles animaux pour étudier la maladie d'Alzheimer. En conséquence, nous prévoyons l'emploi de modèles murins que nous maîtrisons parfaitement au laboratoire et un total de 96 souris sera nécessaire pour ce projet.

La règle des 3 R a été considérée pour la mise en place du projet :

-Réduction du nombre d'animaux suffisants pour permettre des données statistiquement fiables. Les études in vivo développées dans ce projet permettent des approches fonctionnelles sans euthanasie de l'animal permettant un suivi pendant plusieurs semaines réduisant ainsi le nombre d'animaux utilisés

-Raffinement le stress/fatigue/douleur de l'animal est réduit à son maximum par une surveillance quotidienne et l'expérimentation réduite à 10 semaines. Les animaux seront pesés avant et pendant toute la procédure de gavage afin de confirmer la bonne tolérance du traitement et détecter tout problème qui pourrait résulter du gavage répétitif.

-Remplacement. Les animaux ne peuvent pas être remplacés dans ce type d'expériences. La culture cellulaire, du fait de sa connectivité réduite, ne reproduit pas toutes les propriétés.

10271 L'étude décrite dans le présent dossier sera réalisée dans le cadre d'une prestation contractuelle pour le compte d'un client qui développe un composé thérapeutique (composé X). Le composé X possède pour cible pharmacologique un récepteur membranaire dont il a été montré récemment dans la littérature qu'il était impliqué dans le contrôle du transit intestinal. Il a en effet été montré que l'activation de ce récepteur par son ligand naturel induit une accélération du transit intestinal. Or le composé X agit sur ce même récepteurs en favorisant la liaison avec son ligand naturel. Ainsi, le principal objectif de la présente étude est d'évaluer les effets du composé X sur le temps de transit total ainsi que sur la fréquence d'émission et la qualité des fèces chez le rat sauvage en condition de constipation expérimentalement induite.

L'étude consistera en trois phases successives :

- une phase de 6 jours d'acclimatation à l'animalerie après réception.
- une phase de 5 jours d'habituation à la voie d'administration du composé X (voie orale).
- une phase de 3 jours de traitement pendant laquelle sera déterminé l'impact du composé X sur la fonction digestive (temps de transit total, fréquence d'émission et degré d'hydratation des fèces). Pendant cette phase de traitement, les animaux des différents groupes, à l'exception de 15 animaux du groupe contrôle, recevront un traitement connu pour induire un état de constipation modéré (injections répétées de lopéramide à faible dose). Les 15 animaux contrôle ne recevant pas ce traitement seront laissés en condition basales (non constipés) et constitueront ainsi le groupe contrôle du modèle de constipation expérimentalement induite.

Un total de 45 rats Wistar composera cette étude, avec les groupes expérimentaux suivants :

Groupe 1 (état non constipé) : Vehicule / Vehicule (n=15)

Groupe 2 (état constipé) : Lopéramide / Vehicule (n=15)

Groupe 3 (état constipé) : Lopéramide / Composé X (n=15)

La règle des 3Rs a été prise en compte dans l'élaboration du présent protocole :

- Raffinement : Le modèle animal envisagé est un modèle rat (souche Wistar) qui est particulièrement bien documenté dans la littérature pour ce type d'étude. Le choix du modèle rat a été validé avec le client suite à la caractérisation précise du modèle établi au sein du laboratoire lors d'études précédemment menées. Le protocole a été planifié de façon à limiter au maximum tout stress et tout inconfort pour les animaux. Un enrichissement des cages d'hébergement sera assuré par l'ajout de briquettes en bois. Enfin, bien que le protocole soit peu invasif, un suivi journalier des animaux permettra une action rapide en cas d'atteinte des points limites établis.

- Réduction : Le nombre d'animaux utilisés par groupe a été calculé au minimum de façon à pouvoir 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, à ce jour, aucune méthode de substitution n'utilisant pas l'animal de laboratoire et permettant l'étude du transit intestinal et de la qualité des fèces produites après un traitement.

10272 La polyarthrite rhumatoïde (PR) est une maladie chronique, inflammatoire touchant 0.3% de la population française (250.000 patients en France). Cette pathologie entraîne des douleurs autant lorsque l'articulation est au repos que lorsque le patient se sert de celle-ci. Les causes sont inconnues : facteurs génétiques, facteurs environnementaux (fumer augmente le risque de développer une PR) ou existence d'autres pathologies comme le psoriasis au cours duquel les patients accumulent inflammation de la peau et des articulations. La PR est une maladie qui réduit non seulement la qualité de vie mais également l'espérance de vie. Les traitements actuels peuvent permettre une rémission chez une minorité des patients alors qu'ils sont transitoirement efficaces voir inefficaces chez d'autres patients.

L'un des modèles les plus pertinents pour explorer cette pathologie est l'arthrite expérimentale au collagène. Cependant, les résultats obtenus avec ce modèle peuvent être influencés par l'environnement dans lequel est réalisé l'expérience. L'objectif de ce projet est d'étudier l'impact de l'environnement sur l'apparition et le développement des arthrites chez la souris, afin de déterminer les meilleures conditions d'utilisation de ce modèle.

L'utilisation des souris dans cette étude se fera en accord avec la règle des 3R. Le nombre d'animaux utilisés sera réduit au maximum afin de permettre des analyses statistiques solides. Des points limites destinés à limiter l'inconfort et la douleur des souris seront mis en place dans chaque expérience et tous les animaux seront pesés et leur comportement surveillé afin de veiller à leur bien-être. Cette étude devant permettre de déterminer les meilleures conditions d'utilisation d'un modèle animal, il n'est pas possible de remplacer les souris. Ce projet de recherche nécessitera l'utilisation de 135 souris au maximum, sur 2 ans.

10273 Ce projet s'inscrit dans le cadre du développement de traitements pharmacologiques des symptômes de la ménopause ou péri-ménopause mis en œuvre dans le laboratoire.

La ménopause est un événement physiologique qui survient entre 45 et 55 ans chez la femme, et qui correspond à l'arrêt du fonctionnement ovarien entraînant un arrêt de la production de progestérone puis des œstrogènes, marquant ainsi la fin des menstruations et donc de la fertilité.

Cette carence en œstrogènes peut se manifester par des symptômes pouvant affecter la qualité de vie des patientes tels que des bouffées de chaleur, des modifications génitales, des dysfonctions sexuelles et urinaires. C'est aussi une période où, des pathologies potentiellement graves peuvent survenir du fait des changements hormonaux et de l'avancée en âge (fractures ostéoporotiques, maladies cardiovasculaires, cancer).

Un traitement hormonal de la péri-ménopause et ménopause (THM), destiné à remplacer les œstrogènes et la progestérone qui ne sont plus produites par l'organisme, constitue le traitement le plus couramment prescrit aux femmes ménopausées. Cependant, depuis 2002, plusieurs études ont rapporté des effets indésirables graves dont un risque accru de cancer du sein et de l'utérus, et de maladie cardiovasculaires. Ainsi depuis 2003, il n'est plus recommandé d'utiliser un THM de façon systématique ou à titre préventif. Afin de soulager leurs symptômes, certaines femmes sont aussi tentées de se tourner vers des solutions alternatives, dont les potentiels risques ne sont pas encore connus.

Dans ce contexte, il est donc nécessaire de conduire une recherche préclinique intensive visant à mettre en évidence et/ou à développer un traitement des symptômes de la péri-ménopause ou ménopause efficace et offrant une sécurité d'emploi optimale.

Il n'existe à ce jour aucun modèle *in vitro* (remplacement) permettant l'aboutissement de cette démarche, rendant ainsi indispensable l'utilisation d'un modèle intégré faisant appel à des animaux vivants. À ce titre, la rate ovariectomisée s'avère être un modèle préclinique de choix pour la compréhension des événements physiopathologiques associés à la péri-ménopause et ménopause et pour le développement de nouvelles thérapies efficaces. Des études préalables ont d'ailleurs montré, une diminution du taux d'œstrogènes circulants chez la rate Sprague-Dawley ovariectomisée, imitant les modifications physiopathologiques post-ménopausiques humaines.

Du fait des connaissances des modèles/procédures liés au projet et de l'expérience du personnel y participant, il est possible de réduire au minimum (réduction) le nombre d'animaux inclus par groupe de traitement à n=12 pour réaliser des statistiques acceptables, soit un nombre total de n=900 animaux pour l'intégralité du projet sur 5 ans.

Les rates seront hébergées par 2 par cage dès que possible, afin de favoriser leur interaction sociale et réduire leur stress et un enrichissement adapté à leur espèce sera mis en place systématiquement (raffinement). De plus, des protocoles d'anesthésie et d'antalgie adaptés à la sévérité des procédures expérimentales seront suivis assidûment. Enfin, un suivi systématique de l'état général et du poids des animaux sera réalisé, pour une action rapide en cas d'état de souffrance de l'animal.

10274 Le tube digestif joue un rôle majeur dans la digestion et l'absorption des nutriments provenant de l'alimentation.

L'épithélium qui le tapisse est composé de différents types cellulaires directement en contact avec le bol alimentaire.

Les cellules épithéliales intestinales constituent de véritables senseurs de l'état nutritionnel et occupent donc une place privilégiée dans le maintien de l'homéostasie énergétique. Ces cellules participent en effet à la fois à l'absorption des protéines, des lipides et des sucres vers la circulation

sanguine mais aussi à l'émission de signaux neuro-endocrines contrôlant notamment la prise alimentaire et l'équilibre glycémique.

Tandis que de nombreuses études ont mis en évidence un métabolisme intracellulaire actif des nutriments par les cellules épithéliales intestinales, le rôle de ce métabolisme dans l'adaptation intestinale à des signaux nutritionnels variés reste mal connu, en particulier dans le cas de pathologies métaboliques telles que le diabète de type 2 (DT2) ou l'obésité.

Dans ce contexte, notre projet vise à identifier et caractériser de nouveaux acteurs participant à l'adaptation de ces cellules en réponse aux sucres alimentaires dans un contexte physiologique et pathologique. Nous chercherons notamment à déterminer si un facteur de transcription qui modifie les effets transcriptionnels du métabolisme du glucose, dans le foie pourrait moduler le programme génique des cellules épithéliales intestinales en réponse au glucose ou au fructose. Pour étudier les relations entre métabolisme intestinal et maintien de l'homéostasie énergétique, seule une approche intégrée par l'expérimentation animale est envisageable et ne peut être substituée par des analyses réalisées uniquement in vitro.

Dans ce projet, nous utiliserons deux lignées de souris génétiquement modifiées dont le phénotype n'est pas dommageable. Pour étudier l'effet des sucres alimentaires sur l'épithélium intestinal en conditions normales ou au cours de l'obésité/DT2, ces souris seront nourries avec des régimes enrichis en sucres en absence ou en présence de graisses et nous analyserons l'impact de cette surcharge sur les fonctions intestinales (absorptives et endocrines) et sur l'homéostasie glucidique grâce à des tests fonctionnels dont certains sont non-invasifs.

Le nombre de souris utilisées pour ce projet sera de 640. Nous serons extrêmement attentifs à ce que notre démarche expérimentale soit en conformité avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement. Concrètement, les différents protocoles expérimentaux ont été consciencieusement pensés et élaborés afin d'utiliser le moins d'animaux possible tout en permettant d'obtenir des résultats statistiquement satisfaisants. Nous nous attacherons également à limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligée aux animaux, une surveillance journalière des animaux sera réalisée en respectant des points limites bien définis, entraînant l'euthanasie anticipée de l'animal si nécessaire. De plus, tout au long de cette étude, nous réévaluerons la possibilité de faire appel à des méthodes alternatives et des modèles in vitro afin de limiter au maximum l'utilisation d'animaux. La mort des animaux sera vérifiée par absence de respiration et de battement cardiaque.

A terme, les résultats de ce projet permettront de comprendre plus précisément les mécanismes impliqués dans la régulation des fonctions intestinales par les sucres alimentaires. Ils pourraient renforcer ou infirmer l'idée selon laquelle l'utilisation de thérapeutiques agissant sur le métabolisme intestinal des sucres pourrait avoir un effet bénéfique chez des patients diabétiques.

10275 Les maladies métaboliques comme le diabète de type 2 et l'obésité sont généralement associées à une accumulation excessive de lipides dans le foie et à une dyslipidémie systémique. Cette dyslipidémie s'installe suite à une insulino-résistance au niveau du tissu adipeux, où l'action physiologique de l'insuline est de limiter la lipolyse et de réguler les taux de lipides circulants. Il est également connu que l'état de jeune pour 24h induit une insulino-résistance transitoire dans les dépôts viscéraux de tissu adipeux et pour augmenter la lipolyse dans les adipocytes (les cellules graisseuses). L'accumulation anormale de lipides est connue pour induire un stress inflammatoire qui contribue au développement de l'insulino-résistance dans d'autres tissus, pour induire l'épuisement des cellules productrices d'insuline (cellules bêta du pancréas) et pour conduire au développement du diabète de type 2. Il est bien établi aujourd'hui que les cellules immunitaires (notamment les macrophages tissulaires et les monocytes circulants) jouent un rôle clé dans la mise en place du diabète, de la dyslipidémie associée et des complications vasculaires et hépatiques du diabète. Cependant les acteurs moléculaires sont moins bien connus. Récemment nous avons identifié deux protéines, IRF5 (Interferon Regulatory Factor 5) et Elovl2 (Fatty Acid Elongase 2) comme des modulateurs de l'activation inflammatoire des macrophages dans le contexte du diabète. Leur rôle dans l'inflammation induite par les troubles métaboliques (par exemple la dyslipidémie) reste énigmatique. Par/Avec ce projet nous souhaitons démontrer le rôle de ces deux protéines dans les processus cellulaires et moléculaires impliqués dans le développement de la

dyslipidémie induite par l'insulino-résistance du tissu adipeux et mettre en évidence l'influence de ces deux protéines dans le développement du diabète de type 2. Pour étudier le phénomène de l'insulino-résistance du tissu adipeux nous allons appliquer un modèle de jeûne chez des souris sauvages et des souris qui portent une invalidation pour IRF5 ou pour ELOVL2 spécifiquement dans les cellules myéloïdes (progénitrices des macrophages et monocytes). Des données préliminaires (non-publiées) chez l'homme démontrent une dérégulation de l'activation de ELOVL2 et IRF5, confortant fortement notre hypothèse de travail.

La recherche animale est indisponible pour ces études, nous devons développer et caractériser de nouveaux modèles murins pour récapituler les maladies humaines, cela nous aidera à déchiffrer les acteurs pathologiques dans le diabète. La stratégie des 3R (réduire, raffiner, remplacer) sera respectée, par exemple pour les études cellulaires nous allons remplacer les modèles murins par l'utilisation de lignées cellulaires, les mêmes souris seront utilisées pour plusieurs projets d'équipe afin de réduire le nombre total de souris en expérimentation. Les animaux sont acclimatés à l'animalerie et sont habitués à être manipulés avec un suivi de poids hebdomadaire qui permet, en plus des données expérimentales, de s'assurer du bon état de santé des animaux. Une attention très particulière sera effectuée afin de déceler tous comportements anormaux.

Nombre d'animaux utilisé : 160 souris (20 souris par groupe et par condition expérimentale)

Protocole expérimental : étude du phénotype métabolique et inflammatoire des souris invalidées pour IRF5 ou ELOVL2 spécifiquement au niveau des macrophages et monocytes (IRF5 et ELOVL2 MKO) à jeûnes ou sous état nourri pendant 24h.

10276 En France, on assiste au développement d'un nouveau type de régime alimentaire, basé sur une moindre consommation de protéines et une augmentation de la part des protéines végétales dans les protéines consommées. Ce choix alimentaire a des conséquences sur le métabolisme général et en particulier sur le poids des individus et sur la masse grasse corporelle.

Le but de ce projet est de mieux comprendre les mécanismes de contrôle de l'ingestion de protéine et leur relation avec le contrôle énergétique et les conséquences de ces processus sur la régulation du poids et la quantité de masse grasse, et d'identifier si possible des marqueurs biologiques d'un apport protéique considéré comme inadéquat par l'organisme.

Dans une première étude, nous mesurerons le niveau d'ingestion protéique chez des rats qui peuvent choisir librement entre des protéines et un mélange glucides/lipides plus ou moins riche en glucides (entre 30 et 75%) pour s'alimenter. Cette première étude doit permettre de bien décrire comment les glucides et lipides vont influencer sur les niveaux de sélection spontanée des protéines. En nous basant sur l'hypothèse que les niveaux de protéine spontanément choisis au cours de cette première étude sont les niveaux "optimum" pour une teneur en glucides et lipides donnée. Dans une deuxième étude, nous repartirons des niveaux spontanément sélectionnés au cours de la première étude, et nous imposerons une diminution progressive de ces taux jusqu'à un niveau minimum de 5%, considéré comme le besoin d'entretien du rat adulte. Nous mesurerons les conséquences de cette diminution sur la prise alimentaire, le poids et la composition corporelle (en particulier l'adiposité), et l'évolution de différents marqueurs biologiques (métabolomique) qui seront dosés dans le plasma, les urines et les gaz expirés.

Cette étude étant une étude comportementale, elle ne peut être réalisée que sur des animaux éveillés et libres de leurs mouvements. Le rat est une espèce pertinente pour ce type d'étude, dans la mesure où ses régimes et comportements alimentaires présentent des similitudes avec ceux de l'homme. Le protocole a été optimisé pour réduire le nombre d'animaux. Au cours de la première étude, nous avons établi 8 rats par groupe témoin (rats qui ne seront pas en condition de choix alimentaire) et 10 rats par groupe expérimental (rats qui seront en condition de choix alimentaire), les deux rats supplémentaires permettent de tenir compte du fait que la variabilité des réponses individuelles sera sans doute un peu plus grande chez les animaux en condition de choix alimentaire. Nos travaux précédents nous permettent d'estimer ces valeurs comme nécessaires et suffisantes pour révéler des différences statistiquement significatives étant donné le type d'expérience et d'analyse statistique (analyse de la variance) imposés par le projet. Nous testerons 12 régimes dans cette première expérience (4 ratios glucides/lipides et 3 types de protéine) ce qui impliquera l'utilisation de $18 \times 12 = 216$ rats. Dans la deuxième étude, comme pour la première étude,

nous utiliserons 8 rats par groupe témoin (rats qui ne seront pas en condition de choix) et 10 rats par groupes expérimental (rats qui seront en conditions de choix). Nous testerons 15 régimes (5 niveaux d'apport protéique et 3 types de protéines), ce qui impliquera l'utilisation d'un total de $18 \times 15 = 270$ rats. L'ensemble de l'expérience requiert donc l'utilisation de 486 rats.

La procédure expérimentale n'implique pas de manipulations susceptibles d'induire une souffrance physique significative sur les rats de l'étude. Par contre, le protocole impose que les rats soient hébergés individuellement afin de pouvoir mesurer leur prise alimentaire individuelle. Pour limiter le stress induit par cette procédure, les rats sont hébergés dans des cages de plexiglass qui leur permettent de se voir et de se sentir et qui sont enrichies de « jouets » et de niches telles que des tunnels.

10277 La sclérose en plaques (SEP) fait intervenir des mécanismes auto-immuns complexes qui agressent les cellules qui synthétisent la gaine de myéline protectrice dans le système nerveux central. Ce phénomène entraîne des lésions à l'aspect scléreux (épais et dur) appelées plaques, d'où le nom de la maladie. Elles traduisent une démyélinisation et souvent le début d'une perte neuronale.

Les traitements disponibles à ce jour ne permettent pas de guérir, mais ils préviennent les poussées dans les formes récurrentes. Ils ne présentent pas d'efficacité sur les formes progressives de la maladie.

L'injection d'interféron bêta plusieurs fois par semaine reste une thérapie de choix pour le traitement de la sclérose en plaque. Néanmoins, ces injections répétées sont associées à des réactions inflammatoires au niveau du site d'injection. Aujourd'hui, il est donc indispensable de penser à des méthodes innovantes permettant la diffusion du médicament de manière plus compatible avec la clinique.

Scientifiques et industriels travaillent depuis des années au développement de micro-équipements capables de suivre, voire d'agir, sur les influx nerveux et électriques du corps humain. La plupart de ces projets sont toujours à un stade très expérimental. Dans le cas du traitement de la sclérose en plaque par injection d'interféron bêta, le développement d'implants bioélectroniques cellulaires permettrait d'offrir une alternative efficace aux injections répétées.

Notre projet vise donc à développer un dispositif constitué d'une "chambre" (l'implant) contenant des cellules génétiquement modifiées pour sécréter de l'interféron bêta.

Après anesthésie, une chirurgie des animaux permettra l'implantation du dispositif électronique au niveau de la région dorsale sous-cutanée. Une analgésie sera immédiatement induite sur l'animal afin de prévenir toutes douleurs post-opératoires. Cet implant électronique est alimenté par un dispositif sans fil. Une interface optique permet de contrôler à distance les cellules vivantes pour l'expression des gènes codant les protéines thérapeutiques. Les parois de cette chambre sont des membranes semi-perméables laissant diffuser les protéines thérapeutiques. Le confinement des cellules dans l'implant permet au dispositif d'être facilement implanté ou enlevé.

La nouveauté de l'approche réside dans le contrôle de la sécrétion de protéines à visée thérapeutique in situ. L'action thérapeutique associée à un dosage fin de la thérapie préviendrait les réactions immunitaires indésirables comme la douleur et l'irritation locale au site d'injection.

Dans le cadre de ce projet, l'implant bioélectronique programmé pour délivrer un médicament, l'interféron bêta chez le modèle de sclérose en plaque, sera implanté chez l'animal anesthésié. Ce projet ne peut pas être réalisé in vitro car les cellules en culture ne peuvent représenter le système immunitaire complet d'un être vivant.

Pour vérifier que les cellules dans les implants délivrent bien l'interféron bêta, la technique d'imagerie par fluorescence est utilisée, technique non invasive pour l'animal. Les tests préliminaires ont été réalisés in vitro et montre la faisabilité de prototypes bioélectroniques.

Le projet prévoit d'utiliser 344 rongeurs, nés et élevés dans des établissements agréés. Leur nombre a été réduit à un minimum nécessaire pour permettre l'interprétation des résultats par des tests statistiques. De plus, afin d'éviter l'utilisation d'animaux supplémentaires, les échantillons et prélèvements sanguins des animaux seront distribués aux différents groupes de chercheurs prenant part à ce projet de recherche.

Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux. Des protocoles d'anesthésie et d'analgésie ont été définis et validés par une équipe de vétérinaire. Des critères d'arrêt sont prévus dans le projet afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus, et dans ce cas, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de décider d'une euthanasie. Les animaux sont hébergés en groupe dans des cages, enrichies de modules permettant de diversifier leurs activités, et sont observés au quotidien par une équipe en charge de leurs soins.

10278 L'ischémie myocardique ou infarctus du myocarde est dû à l'absence partielle du flux sanguin et donc de l'oxygène dans le cœur. Cette maladie est à l'heure actuelle l'une des principales causes de décès dans le monde. L'ischémie survient lorsque le myocarde ne reçoit plus l'oxygène dont il a besoin par l'apport sanguin. L'agression tissulaire hypoxique qui en résulte peut avoir des conséquences dramatiques et laisser des séquelles indélébiles. Lorsque la perfusion est restaurée et l'oxygénation tissulaire à nouveau possible, on observe alors une forte réaction inflammatoire associée à une production élevée des radicaux oxygénés qui ont un effet néfaste sur les cellules cardiaques. Cet effet paradoxal et indésirable après le rétablissement du flux sanguin constitue le syndrome de reperfusion. La dénomination "Ischémie-Reperfusion" rappelle que les dégâts tissulaires liés à une interruption ou une réduction du flux sanguin, sont le résultat de deux phénomènes : l'effet de l'hypoxie-ischémie (absence d'oxygène) et l'effet de la reperfusion-réoxygénation (apport de l'oxygène).

A l'heure actuelle il existe très peu d'options thérapeutiques pour réduire ces lésions de reperfusion. Deux de ces options sont basées sur l'administration de l'adénosine ou des antioxydants. En essai clinique, l'adénosine a montré un fort effet cardioprotecteur. Cet effet bénéfique était obtenu après l'administration de doses élevées d'adénosine, car celle-ci est rapidement métabolisée dans l'organisme (demi-vie de 2 à 10 secondes). Les doses élevées induisant également des effets secondaires graves ont mené à l'arrêt des essais cliniques. Egalement testés en essais cliniques, les antioxydants, molécules qui protègent contre l'action délétère des radicaux oxygénés, ont montré des résultats mitigés. Ceci étant dû à une faible pénétration dans la membrane plasmique mais également à une faible stabilité et une durée de vie très courte dans la circulation sanguine. Pour contourner ces limitations nous avons développé des nanomédicaments à base de squalène, une molécule naturellement présente dans l'organisme et donc bien tolérée. Il a été précédemment démontré que les nanoparticules de squalène couplé à l'adénosine (Sq-Ade) induisaient un fort effet neuroprotecteur chez la souris avec une ischémie cérébrale.

Le projet actuel vise à évaluer les nanoparticules de Sq-Ade couplées ou non à un autre principe actif (antioxydant Sq-Ade-AO ou anti-apoptotique Sq-Ade-AA) dans des modèles murins d'ischémie/reperfusion myocardique. La validation d'un nouveau nanomédicament nécessite la mise en place d'expériences chez des animaux. Les lésions d'ischémie/reperfusion myocardique sont associées à une forte réaction inflammatoire. Toutes ces modifications ont des répercussions sur le cœur entier non seulement au niveau structural mais également au niveau physiologique (cycle cardiaque, contractions des cellules cardiaques). Les études in vivo nous permettent d'évaluer un effet dans le temps au niveau de l'organe entier mais également de tenir compte de la réponse immunitaire. La procédure expérimentale, réalisée sur des souris anesthésiées, consiste en une thoracotomie latérale (ouverture de la cage thoracique) suivie de la ligature de l'artère coronaire gauche. La reperfusion est réalisée après 30-45 minutes de ligature. Les nanomédicaments vont être administrés avant la reperfusion. L'évaluation de l'effet cardioprotecteur sera réalisée à différents intervalles de temps. La fonction cardiaque sera évaluée par échocardiographie qui est une méthode non invasive. Un calcul statistique nous a permis d'établir le nombre maximal de souris utilisées pour ces expériences. Ainsi pour l'ensemble de cette étude 220 souris seront nécessaires sur 2 ans.

Cet effectif a été déterminé en tenant compte de la règle des 3R : remplacement car les expériences réalisées in vitro nous ont permis de sélectionner les doses de nanomédicaments ainsi que les meilleures formulations à tester sur les animaux. Réduction, car le nombre d'animaux par lot a été calculé grâce à un logiciel afin d'utiliser le minimum d'animaux tout en pouvant mettre en évidence les éventuels effets. Raffinement, car les conditions d'hébergement, d'anesthésie, de la thérapie

antidouleur avant et après l'opération sont prévues pour réduire au minimum toute douleur, souffrance ou angoisse que pourraient ressentir les animaux. Les animaux seront hébergés en groupes sociaux stables formées d'individus compatibles. Chaque animal aura un espace suffisant avec un enrichissement standard.

Bénéfices attendus : cette étude nous permettrait d'évaluer et de valider dans un modèle d'ischémie/reperfusion myocardique des nanomédicaments avec comme objectif un effet cardioprotecteur lors de l'étape critique de la reperfusion.

10279 Le cannabis est une des drogues la plus utilisée dans le monde (166 millions d'utilisateurs dont 15 millions de personnes dépendantes). Les cannabinoïdes, dont le 9tétrahydrocannabinol (THC) est le principe actif du cannabis, sont responsables des effets toxiques et addictifs du cannabis. Ces effets mettent en jeu principalement les récepteurs centraux aux cannabinoïdes de type 1 (CB1). Une sur-activation des récepteurs CB1 a des impacts neurologiques importants et peut être ainsi responsables de nombreux désordres psychiatriques et comportementaux liés à l'abus de cannabis. Découvrir une thérapie pouvant atténuer ces effets toxiques est donc un enjeu de santé publique. Nos travaux de recherche récents ont démontré, chez le rongeur de laboratoire, un mécanisme de régulation qui se met en place dans le cerveau et permet de diminuer fortement les effets toxiques du THC. De fortes concentrations de THC vont activer le récepteur CB1 de façon excessive et un stéroïde, la pregnénolone, va alors être libérée dans le cerveau et agir directement sur le récepteur CB1 pour modifier son activité et bloquer les effets toxiques du THC.

Nous avons développé des stéroïdes synthétiques, qui ont été synthétisés à partir de la pregnénolone et qui miment ses effets, dans le but d'une application thérapeutique chez l'homme. Notre projet de recherches général consiste maintenant à mieux comprendre le rôle physiologique de la pregnénolone et les mécanismes d'action des stéroïdes synthétiques dans la régulation des récepteurs CB1.

Pour cela, notre stratégie est de développer une souris mutante, chez laquelle la pregnénolone ne peut pas se lier au récepteur CB1. En analysant les comportements et la physiologie de ces souris en comparaison aux souris sauvages (non mutées), nous allons pouvoir appréhender dans quelles conditions la pregnénolone agit sur le récepteur CB1 et comment les stéroïdes synthétiques modifient l'activité CB1.

Ce projet vise à maintenir une lignée de souris (Stop-CB1-134G), qui permet de générer une version modifiée du récepteur CB1 et à créer une lignée de souris (CB1-134G), qui exprime le CB1 muté dans tout l'organisme et sera ultérieurement testée pour un projet de recherche fondamentale.

Ici, nous allons évaluer la sévérité des phénotypes (comportements, aspect physiques, poids corporel...) par l'observation des souris génétiquement modifiées depuis la naissance jusqu'à l'âge de 21 jours (moment du sevrage avec la séparation de la mère), puis jusqu'à l'âge de 3 mois, âge auquel débutera le projet de recherches. Ceci nécessitera l'utilisation de 56 souris (28 souris par lignée) sur 2 ans.

Ce projet se fera dans le respect de la règle des 3Rs (Remplacement, Réduction, Raffinement) :

(1) Remplacement : le modèle de mutation du récepteur CB1 a été validé au préalable in vitro ; cependant les systèmes in vitro ou les modèles informatiques ne peuvent pas rendre compte de la physiologie et des comportements de l'animal, dont l'étude sera nécessaire dans le projet de recherche. Le modèle murin choisi dans ce projet est le modèle animal communément utilisé pour pouvoir réaliser des mutations génétiques, de par la similitude du génome de la souris et celui de l'homme. De plus, 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 permettra une extrapolation à l'homme des résultats obtenus dans le projet de recherche.

(2) Réduction et Raffinement : Afin de réduire au maximum la douleur, la souffrance et l'angoisse induites par l'élevage, celui-ci se fera sans intervention extérieure et un enrichissement du milieu composé de plusieurs éléments sera mis en place : cages transparentes, présence de tunnels, ajout de cotons de nidification dans les cages, hébergement en cages collectives. De plus, la procédure d'évaluation phénotypique sera développée de façon à réduire au maximum le nombre et l'inconfort des animaux. Les observations ne nécessitant pas d'euthanasie, un même animal sera observé à

des temps différents. Pour chaque lignée de souris l'étude de phénotype sera réalisée au cours du développement chez les mêmes animaux (14 animaux, dont 7 mâles et 7 femelles) sur 2 portées successives. Avant le sevrage (J21) seule une observation, sans aucune manipulation, des nouveau-nés et de leur mère sera réalisée afin de ne pas perturber la portée. Ensuite, après le sevrage (de J21 à J90), des manipulations non invasives (pesée, observations de signes cliniques à distance ou à manipulation) seront réalisées.

10280 L'accident vasculaire cérébral (AVC) représente la seconde cause de décès après 60 ans et représente 130 000 cas /an en France avec 20% de mortalité à 4 semaines post ischémie.

L'AVC est une interruption de circulation sanguine du cerveau et peut être dû à une ischémie dans 80% des cas (vaisseau sanguin bouché soit par une plaque d'athérome soit un caillot sanguin) ou dû à une hémorragie (rupture d'anévrisme) lorsqu'un vaisseau sanguin est rompu. 60 % des victimes d'AVC meurent ou restent handicapés, il est donc important de connaître les signes avant-coureurs et d'agir rapidement. Le symptôme le plus fréquent d'AVC est un relâchement soudain du visage, du bras ou de la jambe, le plus fréquemment d'un seul côté. D'autres signes peuvent également s'exprimer par un engourdissement ou paralysie du visage, du bras ou de la jambe, particulièrement d'un seul côté, une difficulté à parler ou à comprendre, une confusion mentale, des troubles de la vision, des difficultés à marcher, des vertiges, une perte d'équilibre et un mal de tête intense de cause inconnue.

En cas d'AVC d'origine ischémique, le traitement de référence consiste en l'administration, par voie veineuse, d'une molécule nommée rtPA (pour « recombinaut tissue plasminogen activator » ou « activateur tissulaire du plasminogène recombinant »), capable de dissoudre le caillot sanguin obstruant l'artère. Ce traitement doit être administré dans les 4 heures suivant l'AVC, le plus tôt étant le mieux. Il augmente de 30 % le nombre de patients guéris ou ne présentant que des séquelles minimales.

En deuxième intention, les médicaments antiagrégants plaquettaires sont prescrits après un AVC ischémique, sauf si un traitement anticoagulant est indiqué. Ils empêchent les plaquettes du sang de s'agglutiner et donc les caillots de se former.

Un autre axe thérapeutique est celle du développement de médicaments neuroprotecteurs : de telles molécules pourraient s'opposer à la cascade d'événements neurochimiques qui conduisent à la mort des neurones. En prolongeant la viabilité des cellules, elles permettraient d'étendre la fenêtre d'opportunité thérapeutique.

Il existe des modèles in vitro de cultures de neurones en hypoxie mais ces modèles très utiles sont surtout utilisés en première intention pour la sélection des candidats médicaments montrant une action sur la survie neuronale. A l'issue de ces tests réalisés sur des cultures de neurones les tests in vivo sont une étape importante dans l'étude de l'efficacité préclinique de candidat sur l'aspect de la récupération fonctionnelle sensorimotrice et sur la neuroprotection.

Ce modèle transitoire et focal d'ischémie cérébrale par occlusion transitoire de l'artère cérébrale moyenne réalisé chez le rat compte parmi les modèles précliniques les plus utilisés et est validé par plusieurs molécules de référence comme les antagonistes des récepteurs glutamatergiques, le MK801.

Pour tester l'efficacité d'un candidat médicament sur une série expérimentale, incluant un groupe contrôle négatif (rats saints), un groupe contrôle positif (rats porteurs d'un AVC et traités au placebo), 3 groupes tests (1 composé candidat testé à 3 doses), le nombre total d'animaux pour une série expérimentale est de : 60 animaux. Sur ce modèle d'AVC chez le rat, environ 20% de mortalité est attendu 1 jour après la chirurgie. Ainsi des groupes de 12 rats sont planifiés en début d'étude pour obtenir en moyenne 10 rats par groupe en fin de protocole assurant ainsi une analyse statistique correcte. De même, une lésion ischémique sur un seul hémisphère cérébral est réalisée, permettant ainsi, d'une part, de limiter l'atteinte cérébrale et d'utiliser des tests de comportement latéralisés. En tant que prestataire de services, nous réalisons, pour l'industrie pharmaceutique, en moyenne, 3 études évaluant l'efficacité d'une molécule contre l'AVC, par an, correspondant à 180 animaux. Ainsi, sur 5 ans, une estimation de 900 animaux seront utilisés pour ce projet. Concernant les signes de reconnaissance de la douleur chez le rongeur, les animaux seront évalués quotidiennement par des expérimentateurs qualifiés et nous nous référons à une grille d'évaluation

de la douleur reconnue et publiée. En effet, nous nous focalisons sur l'apparence de l'animal, son examen clinique dans sa cage, l'abreuvement et l'alimentation, le comportement naturel et provoqué. Selon les scores seuils atteints, il y a un déclenchement de décisions (normal, utilisation d'antalgiques appropriés voire l'euthanasie si le point limite est atteint).

10281 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 mucopolysaccharidoses 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 mucopolysaccharidoses, 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 et de glaucome. 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 rongeurs, souris et rats portant la mutation responsable de la mucopolysaccharidose de type VI et l'efficacité d'un médicament sur ces atteintes oculaires.

Pour ce projet nous utiliserons au maximum 480 souris et 480 rats sur 5 ans. Afin de respecter la règle des 3R :

Réduction :

-Le nombre d'animaux par groupe est réduit à son minimum pour cependant rester adapté à l'analyse des résultats par tests statistiques.

-Des évaluations non invasives de la pathologie sont utilisées tout au long de l'étude pour éviter l'euthanasie de l'animal.

Raffinement :

Un suivi quotidien des animaux est effectué afin de minimiser au maximum l'impact sur le bien-être des animaux.

-Des points limites adaptés, suffisamment prédictifs et précoces permettent de limiter une éventuelle douleur à son minimum.

-Les animaux sont hébergés, en groupe dans des cages contenant un enrichissement adapté à l'espèce pour améliorer le bien-être de l'animal.

-Les examens pour évaluer la pathologie sont semblables à ceux pratiqués chez l'homme en cabinet ophtalmologique ou chez l'animal en cabinet vétérinaire.

-Contention douce par un personnel formé à la manipulation des souris et des rats, et, selon les examens pratiqués sous sédation pour éviter le stress 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.

Remplacement : à ce jour, aucune méthode alternative ne permet de mimer l'œil dans son environnement et dans sa globalité fonctionnelle. En effet, l'œil est composé de différents tissus de physiologie différente soumis aux variations environnementales, aux interactions des tissus et organes voisins. Le projet nécessitera donc d'avoir recours à des animaux compte tenu des particularités de l'organe concerné par le projet et l'absence de méthode alternative.

10282 En milieu naturel ainsi qu'en pisciculture, les poissons peuvent être sujets à différents stress environnementaux. Les jeunes stades sont particulièrement plus sensibles aux variations du milieu externe que les juvéniles et les adultes. Les premiers stades de développement correspondent donc à une période critique pour les animaux en élevage et milieu naturel. De plus, plusieurs études montrent que les stress précoces (sur de jeunes animaux) peuvent avoir des conséquences tardives et être ainsi responsables de perturbations de la croissance au stade juvénile et adulte. Une meilleure connaissance des effets de stress périnataux sur la croissance et l'alimentation de l'animal

à long terme devrait permettre d'améliorer certaines pratiques d'élevage mais aussi d'apporter des informations sur les perturbations que subissent les frayères en milieu naturel. En pisciculture il est difficile de contrôler parfaitement la qualité d'eau en élevage et plus particulièrement les niveaux d'oxygène. En milieu naturel les œufs et larves de truite se développent sous frayères. Ces dernières peuvent présenter des niveaux d'oxygène bas du fait de colmatage (sédimentation de particules empêchant le passage de l'oxygène).

Dans la première partie de ce projet, qui fait l'objet de cette demande, nous proposons donc d'exposer des larves de truite arc-en-ciel avant leur première alimentation (entre l'éclosion et la résorption du sac vitellin) à une hypoxie et de suivre leur développement jusqu'à leur 3 mois révolus. Les animaux seront ensuite transportés dans les installations expérimentales piscicoles aux Pays-Bas. Débute alors la seconde partie du projet qui portera sur l'étude des conséquences à long terme (6 mois) après le stress hypoxique : elle sera développée aux Pays-Bas où elle a reçu l'autorisation du comité central pour l'expérimentation animale.

Le nombre de truite arc-en-ciel nécessaire pour cette étude est de 500.

Le projet prend en compte la règle éthique des 3R :

- Remplacer : il n'existe pas d'alternative à cette expérimentation animale car nous recherchons précisément les réponses physiologiques et comportementales des poissons au stress.
- Réduire : le nombre de truite arc-en-ciel utilisées est adapté au plus juste pour permettre une évaluation statistique de la variabilité individuelle de la réponse.
- Raffiner : les prélèvements ne seront réalisés que sur des animaux euthanasiés et ce, dans les conditions réglementaires. Le protocole permettra de décider d'une interruption de l'expérimentation en cas de franchissement du point-limite. Les critères de franchissement des points limites seront les suivants : Si les poissons ne mangeaient plus ou avaient un comportement atypique tel que la nage sur le dos ou en vrille, une fuite anormale à l'alimentation, une léthargie, une hyperactivité locomotrice, l'expérimentation serait interrompue et les animaux concernés seraient euthanasiés. Les densités d'élevage des truites durant l'expérience sont très inférieures à celles utilisées en pisciculture de truite et la qualité d'eau, suivie de manière journalière, est ajustée très régulièrement en fonction des besoins des poissons. Le suivi journalier de la prise alimentaire et des mortalités permet d'assurer un élevage de qualité.

10283 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 activées pourraient avoir des effets délétères par l'exacerbation de l'inflammation mais aussi des effets bénéfiques par leurs propriétés anti-infectieuses. Le récepteur P2Y₁₂ de l'ADP, présent à la surface des plaquettes sanguines, joue un rôle central dans l'activation des plaquettes. Outre les plaquettes, il serait également potentiellement exprimé sur certaines populations de globules blancs. Nous souhaitons évaluer la contribution spécifique du récepteur P2Y₁₂ des plaquettes dans le sepsis.

Ce travail sera réalisé à l'aide d'un modèle de sepsis chez souris, 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 (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 lidocaïne (Xylovet ND 20 mg/ml, forme injectable, 4 mg/kg : injection de 200 µl/souris d'une solution à 0.4 mg/ml) et de bupivacaïne 0.25% (2 mg/kg) : injection de 200 µl/souris d'une solution à 0.2 mg/ml) 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.

- en fin d'expérience, le sang sera prélevé à l'aorte des animaux anesthésiés, qui seront ensuite euthanasiés et les 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. Ce projet nécessitera 92 souris.

10284 L'objectif de ce projet est d'améliorer l'efficacité de traitement hépatique en améliorant la délivrance d'une molécule thérapeutique au niveau des cellules du foie grâce à l'utilisation de différents nano-objets. L'optimisation de la biodistribution de la molécule thérapeutique permettra une accumulation préférentielle au niveau des cellules du foie et limitera l'accumulation (et la toxicité potentielle) dans les autres populations cellulaires. Cette optimisation de biodistribution a pour but ultime d'améliorer le ratio bénéfice-risque du traitement.

Le nano-objet est une nanoparticule organique synthétisée avec des matières premières approuvées. Ce projet a pour but de poursuivre la précédente étude (biodistribution) ayant montré une accumulation au niveau du foie de différentes compositions thérapeutiques. Ce projet est constitué d'études de biodistribution de différentes compositions thérapeutiques sur souris non porteuse de tumeur en vue de comparer la répartition de la composition thérapeutique, toujours en comparaison avec le traitement de référence, dans les différentes populations cellulaires hépatiques. 10 compositions thérapeutiques différentes seront évaluées chacune à 2 doses différentes sur la durée de ce projet. Le nombre de 8 animaux / groupe a été choisi de manière à permettre la mise en place des tests statistiques permettant d'analyser les données de l'étude. Cette procédure expérimentale permet d'évaluer les bénéfices d'une nouvelle composition thérapeutique en comparaison avec un traitement standard utilisé chez l'Homme.

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. Afin de respecter au mieux la règle de 3R et de prévenir toute souffrance animale un suivi des animaux avec mise en place de points limite sera effectuée durant l'étude tel qu'un suivi de l'évolution du poids des animaux, avec des mesures thérapeutiques en cas de baisse de poids (isolement, compléments nutritifs) et une euthanasie de l'animal si la perte de poids dépasse les 15% par rapport au poids initial sur deux jours consécutifs.

Dans sa globalité, le projet nécessitera 480 souris.

10285 Notre équipe s'intéresse aux rôles d'une famille de gènes impliqués dans la synthèse d'acides gras spécifiques aux propriétés physiques particulières. Le premier gène, nommé A, a été découvert à travers une mutation qui induit l'arrêt de son fonctionnement et provoque chez le chien et l'homme une myopathie congénitale caractérisée par une faiblesse musculaire. Nous avons généré des souris mutantes pour ce gène et découvert qu'il est indispensable à la croissance optimale des

fibres musculaires, et donc des muscles, au cours de leur développement. En parallèle, nous avons pu montrer que les souris mutantes pour ce gène présentent à l'âge adulte un profil métabolique très particulier : elles sont résistantes à l'obésité, c'est-à-dire que soumises à un régime riche en graisse qui provoque en quelques semaines une obésité chez des souris contrôles, elles prennent très peu de poids et accumulent peu de graisse. Comprendre comment la perte de fonction du gène A empêche l'obésité pourrait livrer des pistes thérapeutiques pour lutter contre le syndrome métabolique chez l'homme, une affection très commune avec des conséquences dramatiques.

Notre projet vise donc à comprendre comment ce gène, à travers la synthèse de certains acides gras, participe au fonctionnement et au métabolisme musculaire. Pour cela, nous mettrons en œuvre une approche originale, allant des études les plus moléculaires jusqu'à des études fonctionnelles à l'échelle de l'organisme, en passant par une caractérisation des anomalies à l'échelle cellulaire pour décrypter les mécanismes en jeu. Cette approche intégrée s'appuiera sur des études fonctionnelles (exercices musculaires, échocardiographies, réponses métaboliques), transcriptomiques (expression des gènes), lipidomiques, histologiques, biochimiques, de microscopie électronique et de biologie moléculaire.

L'ensemble de ces études, utilisant des souris présentant des combinaisons complexes de chromosomes, parfois obtenues en deux générations, sera réalisé en neuf procédures, au cours desquelles l'utilisation de chaque animal sera rigoureusement optimisée afin de ne recourir qu'au minimum nécessaire pour obtenir des données statistiquement fiables, utilisables par la communauté scientifique et médicale. Au total, 946 souris, au maximum, seront nécessaires à ce projet. Nous apportons un soin extrême dans notre animalerie aux conditions de vie de nos souris, avec beaucoup de matériel d'enrichissement, une densité d'animaux adaptée à leur âge et un confort optimisé pendant la maternité. Par ailleurs, les animaux qui pourraient présenter une faiblesse musculaire à un moment de leur vie feront l'objet de soins très attentifs afin de pallier cette faiblesse ponctuelle si cela s'avère possible ou de les euthanasier avant le développement d'une souffrance dans le cas contraire. Nous serons intransigeants avec toute forme de douleur, que nous réduirons à chaque fois par l'usage d'analgésiques adaptés.

Sur l'ensemble des procédures envisagées, la très grande majorité des actes réalisés correspondra à des prélèvements post-mortem en très grand nombre afin de recueillir le maximum de données de chaque animal utilisé. Les actes réalisés avant la mort comprendront, selon les procédures, des pesées, des exercices spontanés en roue d'activité ou induits, sur tapis roulant, des échocardiographies, des injections, des prélèvements, une anesthésie ou une alimentation riche en graisse. L'optimisation des prélèvements et examens réalisés nous permettra de réduire le nombre d'animaux au strict minimum nécessaire. Certains animaux pourront être réutilisés comme reproducteurs. Enfin, la mise en œuvre d'analyses de pointe, développées en collaboration avec des experts reconnus à l'échelle nationale participera au raffinement de nos procédures. Si l'ensemble de ce projet nécessite actuellement le recours à l'animal, nous mettons en parallèle en œuvre des études in vitro, complémentaires, afin de réduire le nombre d'animaux utilisés aux seules études ne pouvant être réalisées in vitro.

In fine, notre projet permettra de révéler de nouveaux mécanismes impliqués dans le fonctionnement et le métabolisme musculaire. De notre capacité à comprendre ces mécanismes jusque dans leur précision moléculaire dépendra la possibilité de leur translation pour la compréhension et le traitement de certaines affections humaines, qu'il s'agisse de certaines myopathies congénitales rares ou d'affections potentiellement fréquentes comme le syndrome métabolique.

10286 La thérapie génique a progressé ces dernières années et des protocoles cliniques sont actuellement testés chez l'homme. Néanmoins, plusieurs obstacles doivent être surmontés avant que ce type de thérapie soit couramment utilisée. Une limitation majeure à l'utilisation de la thérapie génique est la nécessité de moduler l'expression d'un transgène en terme de durée et de niveau d'expression. Nos connaissances dans le domaine de la nutrition protéique nous ont permis de concevoir un système d'expression génique inductible par une manipulation nutritionnelle. Ce système breveté est basé sur l'association (i) d'un promoteur artificiel fortement inductible par une carence en un AAI qui est encapsulé dans un vecteur viral AAV avec (ii) une nourriture carencée

en un AAI qui entraîne une forte baisse de la concentration sanguine de AAI limitant et permet l'induction du transgène via une voie de signalisation appelée GCN2/ATF4.

Ce système présente de nombreux avantages : (i) il permet de contrôler précisément l'induction d'un « gène médicament » en terme de durée et d'intensité et (ii) il ne présente aucune toxicité. Si le traitement doit être renouvelé, il sera possible d'alterner la carence en différents AAI. Sur ce point, notre système présente un avantage unique par rapport aux autres systèmes inductibles qui ne sont pas utilisables en médecine humaine. Ce système est un outil fonctionnel dans plusieurs tissus et utilisable en thérapie génique pour exprimer n'importe quel « gène médicament » de façon localisée et régulée. Cette modulation spatio-temporelle ouvre de nouvelles perspectives à la thérapie génique pour le traitement d'un grand nombre de pathologies (cancer, maladies neurodégénératives, maladies rares, ophtalmologie, thérapie cellulaire...).

Nous souhaitons apporter une preuve de concept de la fonctionnalité de ce système dans un modèle animal de pathologie de façon à pouvoir rapidement transférer cette technologie à l'homme. Nous avons choisi un modèle murin de métastases hépatiques du cancer colorectal (MHCC) que l'on traitera par l'expression contrôlée d'un gène apoptotique.

Ce projet, qui va impliquer 120 souris sur une période de 2 ans, sera réalisé selon la réglementation 2010/63/UE et selon la règle des 3R (Réduction, Remplacement, Raffinement) :

- Le nombre d'animaux utilisés pour chaque expérience est calculé au minimum en fonction du test statistique retenu (Réduction).

- Durant l'étude, tout sera mis en œuvre pour minimiser le stress auquel les animaux sont soumis (Raffinement). Les animaux seront hébergés en groupe, et des éléments d'enrichissement du milieu seront mis à disposition (tube plastique rouge ou bille métallique). Pour chaque expérience, des points limites (perte de poids, prise alimentaire, comportement...) seront définis et des groupes "contrôle" adaptés au protocole seront constitués. Si un animal présentait un état douloureux inacceptable, ou des signes de mal être important, il sera examiné par un responsable du bien-être animal en coordination avec un responsable de la mise en œuvre du projet, et si nécessaire, anesthésié puis euthanasié. Par ailleurs, l'utilisation de cellules exprimant la luciférase pour générer les métastases nous permettra de suivre leur évolution à l'aide d'une méthode non invasive.

- Ces expériences vont permettre de valider l'efficacité de l'expression contrôlée d'un gène apoptotique pour le traitement des MHCC chez la souris. L'efficacité des vecteurs sera préalablement testée in vitro sur cellules de souris en culture. Le modèle animal de cancer permet d'étudier l'effet tumoricide du système dans une situation réelle et globale, proche de ce qui est envisagé en clinique humaine. (Remplacement).

10287 Le projet s'inscrit dans le cadre d'études visant à évaluer quelles pourraient être les conséquences pour l'épithélium colique de l'utilisation de deux produits actuellement commercialisés pour le lavement du côlon en préparation d'une colonoscopie, le FORTRANS et l'IZINOVA. Ces produits de lavement permettent une observation endoscopique optimale en libérant le côlon de toute matière fécale car en retenant l'eau du lumen et/ou en stimulant sa sécrétion par l'épithélium intestinal, ils génèrent une diarrhée dite « osmotique ». En effet les principes actifs de ces produits, n'étant pas librement diffusibles à travers la membrane des cellules de l'épithélium, ils génèrent une forte pression dite « osmotique » et en conséquence un appel d'eau de l'organisme vers le lumen du colon pour maintenir l'équilibre osmotique. Ce phénomène, qui entraîne la diarrhée, même s'il n'a pas à ce jour entraîné d'effets indésirables graves chez les personnes saines, il peut provoquer une déshydratation grave chez des personnes fragiles, âgées ou présentant des problèmes cardiaques. Ces produits de lavement osmotiques, sont en effet contre-indiqués en cas des maladies inflammatoires chroniques du colon (maladie de Crohn, rectocolites ulcéreuse). Ils sont cependant utilisés en préparation des colonoscopies de surveillance et de prévention du risque cancéreux accru chez ces patients. Des laxatifs analogues du FORTRANS sont aussi en vente libre et couramment utilisés pour le traitement de la constipation chronique.

Des études in vitro qui viennent d'être réalisées dans notre laboratoire sur un modèle cellulaire intestinal ont montré qu'un environnement à forte pression osmotique, constitue un stress en perturbant le fonctionnement normal des cellules. Nous nous proposons maintenant de réaliser une étude in vivo sur des rats pour estimer plus précisément les risques pour la santé de la muqueuse

du colon liés à l'utilisation des produits pour lavage colique produisant une diarrhée osmotique. Après traitement avec les produits FORTRANS et IZINOVA, nous effectuerons sur ces animaux, euthanasiés sous anesthésie, plusieurs analyses au niveau de la muqueuse du côlon : fonctionnelles (tests de perméabilité trans-épithéliale, évaluation de la consommation en oxygène des cellules de la muqueuse colique), histologiques (évaluation de la morphologie de l'épithélium colique), biochimiques (expression des protéines spécifiques à la fonction de l'épithélium colique, mesure de l'inflammation) et géniques (expression des gènes impliqués dans l'inflammation, dans la perméabilité aux électrolytes, dans la fonction barrière et dans la signalisation intracellulaire). Les procédures expérimentales envisagées ne peuvent donc pas être remplacées par d'autres méthodes alternatives n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants et susceptibles d'apporter le même niveau d'information. Nous utiliserons des rats comme modèle animal car la taille de leur colon peut permettre de réaliser sur un même animal la totalité des mesures envisagées. De plus des études précédentes, effectués par d'autres laboratoires avec un analogue du FORTRANS, ont utilisé le rat comme modèle animal.

Le nombre total de rats prévu pour ce projet sera de 69 à répartir dans trois groupes (contrôle, FORTRANS et IZINOVA). Une petite partie de ces animaux (9 rats) servira pour la réalisation d'une expérience préliminaire visant à définir la tolérance aux produits et le temps nécessaire à la vidange intestinale. L'expérience principale sera réalisée sur 3 groupes de 10 animaux et les 30 animaux restants seront utilisés seulement si les résultats de cette première expérience montrent des effets significatifs pour effectuer des analyses plus approfondies. Le nombre de 10 animaux par groupe constitue le minimum nécessaire pour obtenir des résultats exploitables sur le plan statistique, prenant en compte la variabilité interindividuelle et la faible intensité des phénomènes physiologiques et moléculaires à mesurer ainsi que le risque de perte d'échantillons lors des tests fonctionnels de perméabilité trans-épithéliale ex vivo.

Les expériences envisagées seront menées dans le respect du bien-être animal. Les procédures stressantes seront limitées au maximum (les rats seront manipulés tous les jours pour les habituer à ce geste et un enrichissement du milieu sera réalisé (tunnel en plexiglas). Des quelques publications scientifiques précédentes, nous savons que les composants du FORTRANS sont bien tolérés par les rats, mais la réalisation de l'expérience préliminaire nous permettra de confirmer si les deux produits à tester sont bien tolérés par les rats dans nos conditions expérimentales ou si apparaissent des signes de souffrance qui mèneront à arrêter l'expérimentation.

10288 La maladie de Huntington (MH) est une maladie neurodégénérative de l'adulte incurable à ce jour. D'origine génétique, sa prévalence est de l'ordre de 1/10000. Les symptômes associent mouvements involontaires (chorée), déficits cognitifs et troubles de la personnalité et s'expliquent par une atteinte préférentielle du striatum dans le cerveau. De nombreux modèles murins ont été générés, dont le modèle transgénique R6/1, modèle très utilisé par la communauté scientifique. Ce modèle récapitule des phénotypes majeurs de la maladie et constitue un outil inestimable pour l'étude des mécanismes physiopathologiques et la réalisation de traitements précliniques. Alors que le phénotype moteur des souris "Huntington" a été largement étudié et est utilisé comme marqueur lors des tests précliniques, le phénotype cognitif reste peu caractérisé. L'atteinte des fonctions cognitives, incluant des difficultés à mobiliser les connaissances acquises et à s'organiser et à prendre des décisions est pourtant un symptôme et marqueur précoce de la maladie, qui a un impact substantiel sur la qualité de vie des patients. Ainsi, une meilleure caractérisation des fonctions cognitives chez les souris modèles Huntington apparaît aujourd'hui nécessaire non seulement pour comprendre les mécanismes responsables des atteintes cognitives mais aussi pour évaluer de façon précoce les bénéfices potentiels d'un traitement lors de la réalisation de test précliniques. Le striatum est nécessaire à certains apprentissages comme des automatismes moteurs, mais aussi à certains apprentissages de type declarative-like qui mettent en jeu une mémoire dite procédurale (permet de résoudre une tâche répétitive par un comportement automatique). Des tests de comportement adaptés au rongeur permettent d'étudier cette mémoire procédurale. L'objectif de l'étude proposée est de caractériser la mémoire procédurale des souris R6/1 à l'aide d'un test de comportement approprié -le labyrinthe du double-H-, développé récemment au laboratoire chez le rat et qui permet spécifiquement d'évaluer cette mémoire ainsi

que son interaction avec la mémoire spatiale. L'étude se déroulera ainsi en deux étapes : 1) adapter le test du labyrinthe du double-H à la souris; 2) évaluer la mémoire procédurale des souris R6/1 dans ce test; 3) évaluer la mémoire spatiale des souris R6/1; 3) établir la relation causale entre altérations moléculaires/cellulaires et déficits de mémoire chez les souris R6/1. Prenant en compte la stratégie des 3R (remplacement, réduction et raffinement) et des calculs de puissance, nous limiterons le nombre de souris utilisées au minimum nécessaire (i.e. à 1006 animaux) pour obtenir des résultats statistiquement exploitables. La maladie de Huntington est une maladie neurodégénérative complexe qui affecte plusieurs structures du cerveau. Les modèles murins de la maladie, en particulier le modèle R6/1 qui récapitule des phénotypes majeurs de la maladie, sont des outils précieux pour l'étude des mécanismes physiopathologiques. Par ailleurs, dans un souci de raffinement du projet et du respect du bien-être animal, l'étude sera menée de façon générale à un âge où les animaux ne sont pas atteints des symptômes les plus invalidants de la MH. Enfin, un suivi quotidien des souris sera réalisé afin d'anticiper tout signe nécessitant chez l'animal des soins particuliers.

10289 L'infection par le virus de l'hépatite B (VHB) évolue vers la chronicité quand elle survient chez le jeune enfant alors qu'elle guérit souvent spontanément quand elle se produit chez l'adulte. Les raisons de cette différence d'évolution restent encore mal comprises et il est souvent évoqué une immaturité du système immunitaire pour expliquer cette persistance de la réplication virale. Il a très récemment été démontré que la présence et la qualité de la flore digestive influencent le devenir de l'infection chez un modèle murin infecté par VHB : l'absence de flore ou une flore immature favorise la chronicité de l'infection, mimant l'effet de l'âge sur la chronicité de l'infection chez l'homme.

La flore digestive participe pleinement à plusieurs fonctions de l'hôte ; elle influe par exemple sur la réponse immunitaire et elle est une composante essentielle de plusieurs voies du métabolisme, dont notamment au métabolisme des sels biliaires. Un des récepteurs des sels biliaires semble fortement impliqué dans la propagation du VHB. L'objectif est d'étudier les effets de la modulation de l'activité de ce récepteur sur la réplication du VHB en fonction de la maturité de la flore digestive chez des souris jeunes (flore immature) ou adultes (flore mature) et aussi en fonction de l'absence de la flore chez les souris adultes après traitement antibiotique.

Le rôle de ce récepteur dans l'infection par le VHB sera aussi étudié en utilisant des souris déficientes pour ce récepteur. Les modèles cellulaires ne permettent pas d'étudier les interactions entre les différents tissus impliqués, le foie, le microbiote et le système immunitaire, le modèle animal nous permettra d'étudier l'infection par le VHB dans cet environnement complexe.

Cette étude permettra de comprendre comment la maturation du système immunitaire ou les conditions métaboliques, différentes entre les enfants et les adultes propres à l'enfance, jouent un rôle dans l'évolution de la pathogénèse induite par le VHB.

Des souris d'âges différents ou traités sous antibiotiques seront infectées par le VHB. Cela nous permettra d'étudier l'impact de la flore (microbiote) sur l'infection. En parallèle, des animaux déficients pour le récepteur d'intérêt et infectées par le VHB nous permettront de caractériser le rôle de ce récepteur dans l'infection.

Remplacement : Les interactions entre le système immunitaire, le microbiote et l'infection par le VHB constituent un phénomène biologique complexe faisant intervenir de multiples types cellulaires et une organisation unique ce qui rend impossible une étude complète dans des tests *in vitro* (interaction avec d'autres cellules, tissus etc.), c'est pour cette raison que le modèle expérimental chez la souris est indispensable et ne peut pas être remplacé. Des études préliminaires réalisées *in vitro* ont permis de confirmer nos hypothèses de travail avant de poursuivre sur les modèles murins.

Réduction : Le nombre d'animaux utilisés par groupe expérimental dans chaque procédure suivra l'esprit de la règle des 3R. Ainsi, le nombre de souris utilisé dans les protocoles a été optimisé afin d'obtenir des résultats statistiquement valables tout en minimisant leur nombre.

Raffinement : De nombreuses analyses seront réalisées *post mortem* sur les échantillons prélevés en fin d'expérience. Tout au long des expériences, nous veillerons au bien-être des animaux et à réduire au maximum la souffrance ou l'angoisse des souris (définition précise des points limites,

administration de médicaments pour supprimer la douleur si nécessaire, choix des méthodes d'injections les moins invasives etc.).

Le nombre maximal d'animaux utilisés pour ce projet est de 380 souris.

10290 Le Syndrome néphrotique idiopathique (SNI) représente 85% des néphropathies d'origine glomérulaire de l'enfant et 25-30% de celles de l'adulte. Il se caractérise par une fuite massive des protéines dans les urines (protéinurie). L'origine et les mécanismes de la maladie restent incomplètement compris. L'ensemble des résultats obtenus par l'équipe montre : i) une forte expression de la protéine c-mip dans le SNI ainsi que dans des modèles expérimentaux chez la souris ; ii) le rôle direct de c-mip dans l'apparition d'une protéinurie chez les souris transgéniques qui expriment sélective c-mip dans la cellule rénale appelée podocyte ; iii) l'extinction de l'expression de c-mip bloque le développement de la protéinurie. Ces résultats suggèrent que c-mip joue un rôle fondamental dans les atteintes podocytaires au cours du SNI à rechutes. Cependant, rien n'est connu sur le rôle de c-mip à l'état physiologique dans les différents organes. Des souris dont le gène de c-mip est inactivé constitutivement (souris KO constitutif général pour c-mip) ont permis de montrer que cette inactivation était létale au niveau embryonnaire et des résultats préliminaires sur des souris dont l'inactivation du gène peut être induite (KO conditionnel général) semblent montrer que l'inactivation générale chez l'adulte est également létale sans que la cause de cette létalité soit connue. Des analyses de ces résultats préliminaires semblent indiquer que c'est une atteinte du système digestif dans les souris KO qui serait à l'origine de la létalité.

L'objectif poursuivi dans cette étude est de connaître le rôle et les partenaires de c-mip dans l'appareil digestif afin de comprendre les mécanismes impliqués dans la létalité.

Afin d'étudier le rôle de c-mip, il nous est paru important de générer des souris KO conditionnelles qui puisse nous aider à définir le rôle de c-mip dans les divers organes adultes ainsi qu'au cours de la gestation. Nous utiliserons des souris KO c-mip conditionnel générale (Souris RosaCreERT/CmipLox) et KO c-mip conditionnel dans les cellules épithéliales intestinales (Souris VillinCreERT/CmipLox). Afin de réduire le nombre de souris nécessaires à l'étude, les souris « contrôle » non KO (C57Bl/6 et Rosa CreER/CmipLox) serviront pour les 2 temps envisagés au cours de l'étude. L'ensemble de l'étude planifiée sur 5 ans nécessitera l'euthanasie de 300 souris C57Bl/6 ; 600 souris Villin CreER/CmipLox et 900 souris Rosa CreER/CmipLox.

Tous ces animaux auront un suivi tout au long des expériences pour éviter leur souffrance, ils seront régulièrement observés et il sera vérifié qu'il n'y a pas de signes indiquant une souffrance comme la perte de poids, la prostration, l'agressivité ou le refus de s'alimenter. Pour le bien-être des animaux, nous leur rajoutons dans leur milieu de vie, des bâtonnets de bois, du coton, et des maisonnettes pour stimuler leur activité naturelle.

10291 La progression des cancers digestifs est fortement liée à l'environnement de la tumeur. A ce jour, aucune étude scientifique n'a pu expliquer comment un environnement tumoral pouvait se mettre en place. Nous tenterons de répondre à cette question en testant l'hypothèse selon laquelle certaines cellules de l'intestin peuvent sécréter des molécules capables de créer un environnement pro-tumoral.

Ce projet sera mené selon les modalités du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R ». (1) L'étude de l'inflammation est un phénomène complexe, impliquant de nombreux types cellulaires, non reproductible in vitro. Nous utiliserons des souris transgéniques afin de tester nos hypothèses de travail dans un modèle intégré (2) L'élevage des animaux se fera dans un milieu enrichi (maisonnette, carrés de cellulose) sous la supervision de personnels qualifiés des animaleries. Les animaux feront l'objet d'un suivi scrupuleux des points limites, 2 fois par mois, selon une grille d'évaluation établie. (3) Le nombre d'animaux requis pour ce projet a été défini selon une approche statistique rigoureuse permettant d'atteindre nos objectifs scientifiques et ainsi minimiser le nombre d'animaux à utiliser. De plus, nous utiliserons des animaux des deux sexes sans a priori, ceci permettant de réduire le nombre d'individus à produire. Ce projet sera basé sur l'utilisation de modèles murins afin de se rapprocher au mieux d'un contexte de physiologie intégrée. Nous utiliserons 1 lignée transgénique, soit un total d'animaux estimé à 160 individus, sur une durée totale de projet de 2 années.

10292 La protéine IL411 est une enzyme produite par des cellules du système immunitaire (cellules qui défendent l'organisme contre les agents infectieux, les tumeurs et les agressions) chez l'homme et la souris. Nous avons précédemment montré qu'elle freine la réponse immunitaire en bloquant les fonctions d'une catégorie de cellules du système immunitaire appelée lymphocytes T. Les lymphocytes T jouent un rôle anticancéreux en reconnaissant et tuant les cellules cancéreuses. Or, IL411 est détectée dans les cancers humains. Nous avons déjà montré chez la souris que la présence d'IL411 est favorable à la croissance tumorale en permettant aux cellules cancéreuses d'échapper à la mort induite par les lymphocytes T. Ainsi, chez l'homme, la présence d'IL411 dans les tumeurs pourrait être responsable d'une croissance plus rapide du cancer associée à un mauvais pronostic. Il est nécessaire de comprendre le mécanisme d'action d'IL411 dans le but de développer de nouveaux traitements.

Nous cherchons actuellement à comprendre de quelle façon IL411 conditionne les lymphocytes T à ne plus tuer les cellules cancéreuses. Nous allons utiliser un système in vitro pour activer des lymphocytes T anticancéreux selon différentes modalités, incluant ou non la présence d'IL411 (ces lymphocytes T sont obtenus à partir de la rate d'une souris donneuse). Puis nous injecterons les lymphocytes T activés à des souris receveuses, ayant préalablement reçu une injection sous-cutanée de cellules cancéreuses. Ce test est le seul qui puisse prouver la fonctionnalité anticancéreuse des lymphocytes T conditionnés in vitro. Il permettra de comparer le niveau d'influence d'IL411 sur la capacité protectrice des lymphocytes T.

Des tests in vitro préalables nous ont permis de sélectionner les conditions à tester in vivo de façon à réduire le nombre de lots d'animaux à expérimenter. Différents biais techniques et biologiques obligent à tester un minimum de 8 animaux par groupe et à répéter le test 5 à 6 fois. D'autre part, le système de conditionnement in vitro comporte plusieurs modalités d'activation, qui devront toutes être évaluées successivement, car elles correspondent à des conditions physiologiques différentes. Du fait de la lourdeur technique, elles ne pourront être évaluées simultanément et un contrôle de reproductibilité devra donc être introduit à chaque fois.

Une mise au point de départ sera nécessaire pour définir la quantité de lymphocytes T à injecter nécessaire à contrôler la croissance de la tumeur.

Les premiers jours de développement tumoral, la taille de la tumeur sous-cutanée devra pouvoir être mesurée, puis les animaux seront euthanasiés avant que la tumeur produise une gêne significative.

Ces animaux seront observés quotidiennement et leur environnement sera contrôlé de façon à optimiser leurs conditions de vie. Des mesures d'enrichissement du milieu telles que briquettes en bois, maisonnettes en plastique, feuilles de cellulose pour faire un nid seront prises. Toutes les injections seront réalisées sous anesthésie.

Le nombre total d'animaux nécessaires est évalué à 672.

10293 Dans le cadre des missions de référence européenne (LR-UE) et nationale (LNR), nous devons régulièrement évaluer la performance des laboratoires intervenant dans l'analyse des résidus de médicaments vétérinaires ou de produits interdits dans les denrées d'origine animale (muscle, foie, rein, graisse, œuf, lait) ou dans des matrices biologiques de référence telle que le sang, le plasma ou l'urine. Cette évaluation se fait par l'organisation d'essais inter laboratoires d'aptitude (EILA) qui nécessite la fourniture d'échantillons biologiques aux laboratoires concernés. Il serait possible de compléter par des résidus de médicaments vétérinaires des matrices biologiques issues d'animaux provenant d'abattoir, évitant ainsi l'utilisation d'animaux d'expérimentation. Cependant, ce mode de préparation pose plusieurs problèmes : (i) les échantillons issus d'animaux d'abattoir ne reflètent pas le « matériel » de terrain car il y a absence de métabolisme et donc, par voie de conséquence, certains résidus de médicaments vétérinaires y sont absents, (ii) il n'est pas évident de garantir l'absence de résidus autres que les résidus recherchés pour l'évaluation de l'aptitude (issus uniquement de traitements dans les élevages). De ce fait, il est nécessaire de recourir au traitement, par des spécialités vétérinaires, d'animaux spécifiquement dédiés pour ce projet, en respectant les schémas posologiques préconisés dans les autorisations de mise sur le marché (AMM). Dans le cas de l'évaluation de l'aptitude pour la recherche de molécules interdites chez les animaux de rente, le traitement sera réalisé avec des spécialités vétérinaires utilisées chez les

animaux de compagnie selon le principe d'extrapolation de dose couramment utilisé en pharmacologie vétérinaire. Le but du protocole étant de générer du matériel biologique reflétant de vrais échantillons comme ceux trouvés dans les élevages. Une période d'acclimatation de 7 jours réalisée dans nos installations, associée à une alimentation dépourvue de médicaments vétérinaires et de traitement, permet de garantir l'absence de résidus de médicament vétérinaire chez les animaux qui sont utilisés pour l'EILA. Le nombre d'animaux est minimisé de façon à avoir la quantité suffisante en matériel biologique pour assurer l'évaluation du réseau de laboratoires participant à l'EILA. L'administration des médicaments aux animaux se fait soit par voie orale soit par voie parentérale. Les espèces utilisées sont des volailles (poulets, poules pondeuses, dindes), des porcins et des ovins. Le nombre d'animaux prévus sur 5 ans est de 30 volailles, de 20 porcins et de 10 ovins. Dans un souci d'amélioration du bien-être animal, un enrichissement de l'environnement des animaux est systématiquement prévu. Lors de chaque EILA, les animaux sont euthanasiés et des échantillons biologiques sont prélevés et envoyés aux laboratoires participants.

10294 Le lactate, produit de la dégradation du glucose par la glycolyse, a longtemps été considéré comme un déchet. Cependant, depuis une vingtaine d'année, ce dogme est remis en cause. En particulier, l'idée a progressivement émergé que la compartimentation du lactate cérébral, c'est-à-dire sa distribution entre différents types cellulaires et l'espace extracellulaire, joue un rôle fondamental pour la neurotransmission et la plasticité cérébrale. Des dérèglements du métabolisme du lactate, probablement liés à sa compartimentation, ont également été rapportés dans des maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer. Pourtant, ces notions de compartimentation du lactate restent mal comprises et débattues. Ceci est largement dû à l'absence d'outils pour évaluer la compartimentation du lactate cérébral de manière non-invasive.

L'objectif global de notre projet est de développer de nouvelles méthodes de spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) *in vivo*, pour quantifier la compartimentation du lactate dans le cerveau de manière non-invasive. Après des développements méthodologiques *in vitro*, les méthodes RMN développées seront optimisées chez la souris. Des nouvelles approches numériques développées dans ce projet permettront de modéliser les données de spectroscopie RMN afin d'en extraire les valeurs quantitatives des fractions de lactate présentes dans les neurones, les astrocytes et le milieu extracellulaire. Cette saisine porte sur ces développements méthodologiques en RMN par lesquels doit débiter le projet. Par la suite, et ceci fera l'objet d'une autre saisine, les méthodes seront évaluées *in vivo* dans des modèles murins (souris) où la compartimentation du lactate est supposée changer.

Les souris, nées et élevées en captivité, proviennent d'un élevage agréé. Leur nombre est réduit à 60, soit le minimum nécessaire pour développer les méthodes et atteindre une bonne précision de mesure.

Le recours à l'animal est nécessaire car aucun milieu de culture ou système synthétique ne permet aujourd'hui de reproduire la complexité des cellules du cerveau, en particulier les interactions métaboliques de ces cellules. Les modèles rongeurs sont pertinents car ils peuvent être observés *in vivo* par des scanner IRM à haute performance et ce, malgré la petite taille des cerveaux murins. Les souris seront examinées par RMN à plusieurs reprises (une douzaine de fois sur une durée d'un an), avant d'être euthanasiés à la fin de l'étude. Avant l'examen RMN, certains animaux recevront une injection intracérébrale d'une molécule visible en RMN et restant dans le milieu extracellulaire en raison de l'absence de transporteurs, afin de caractériser par RMN les propriétés, à ce jour encore mal comprises, de la diffusion moléculaire dans le milieu extracellulaire. Ces animaux ayant reçu une injection intracérébrale seront euthanasiés immédiatement après l'examen RMN. Toutes les procédures seront effectuées sous anesthésie générale et avec application locale d'analgésique afin d'éviter tout stress ou douleur liés à la chirurgie ou au système de positionnement de l'animal qui diminuerait le bien-être des animaux. Un suivi quotidien est assuré pour surveiller l'apparition de problèmes de santé. Des critères d'arrêt sont mis en place afin d'éviter toute dégradation importante de leur bien-être.

10295 Le syndrome néphrotique idiopathique (SNI) est une affection rénale qui représente 85% des néphropathies d'origine glomérulaire de l'enfant et 25-30% de celles de l'adulte. Elle se caractérise

par une fuite massive des protéines dans les urines (protéinurie) due à une désorganisation de la barrière de filtration rénale. L'origine de la maladie et ses mécanismes restent incomplètement compris. Le traitement de cette maladie est basé sur les corticoïdes et/ou d'immunosuppresseurs ce qui expose souvent les patients à des effets secondaires notables (diabète cortico-induit, ostéonécrose, retard staturopondéral chez les patients jeunes, etc.). Notre équipe a identifié la protéine Cmpip comme étant une cible potentielle pour développer une thérapie génique dans le cadre des SNI. En effet, le gène Cmpip est fortement exprimé dans les lymphocytes (cellules de l'immunité) et les podocytes (cellules spécialisées du rein, elles sont un élément essentiel de la barrière de filtration), lors des poussées de la maladie. Nous avons démontré, dans des modèles expérimentaux chez la souris, que l'inhibition de l'expression de Cmpip dans les podocytes par des injections intraveineuses de RNA inhibiteurs du type siRNA protégeait ceux-ci de la survenue d'une protéinurie. La durée de vie des siRNAs in vivo étant limitée, nous avons décidé de développer des nanocapsules thérapeutiques basées sur l'association d'un vecteur permettant l'expression de RNA inhibiteur (RNAi) de Cmpip, et de nanocapsules de Chitosan. Cette approche thérapeutique permettrait, si elle est réalisée avec succès in vivo, d'éviter des traitements lourds à base de corticoïdes et d'immunosuppresseurs. Actuellement il n'y a pas de traitements alternatifs. Pour les patients résistants à ces traitements, il n'y a également aucune alternative. Notre objectif est de réaliser et d'optimiser des nanocapsules thérapeutiques qui seront testées sur des modèles expérimentaux chez la souris, ainsi que sur une lignée de souris transgénique qui surexprime cmpip dans les podocytes (lignée développée par notre équipe). Le but est que les nanoparticules thérapeutiques une fois injectées puissent parvenir jusqu'à leur cellule cible, le podocyte et permettent à cette cellule de produire les RNAi nécessaires pour éliminer la protéine délétère cmpip et inverser la protéinurie. Les modèles de syndrome néphrotique expérimentaux chez la souris ainsi que le modèle de souris transgénique sont indispensables à notre étude car il n'est pas possible actuellement de recréer avec des cellules en culture la complexité de la barrière de filtration rénale. Si cette stratégie est un succès, elle aura des retombées importantes en thérapie humaine et nous pourrions envisager d'appliquer cette stratégie à d'autres pathologies podocytaires associées à des mutations délétères de protéines de structure de la barrière de filtration rénale. Malheureusement, il n'est pas encore possible de recréer la barrière de filtration rénale in vitro, ce qui nous oblige à utiliser des modèles murins. Cependant, afin de réduire le nombre de souris nécessaire, l'efficacité intracellulaire des vecteurs sera testée sur cellules en culture. Nous réduirons pour chaque test, le nombre de souris à 5 ce qui nous permettra néanmoins d'avoir des résultats statistiquement valables. Au total pour la durée de 5 ans de l'étude, nous utiliserons 600 souris Balb/c et 170 souris de la lignée transgénique nephrin-Cmpip.

Tous ces animaux auront un suivi régulier tout au long des expériences pour éviter toutes souffrances. Nous vérifierons qu'ils ne présentent pas des signes d'un mal être comme la perte de poids, la prostration, l'agressivité ou le refus de s'alimenter. Leur espace de vie sera enrichi par le rajout de bâtonnets de bois, du coton, et des maisonnettes pour stimuler leur activité naturelle.

10296 Ce projet repose sur des méthodes invasives d'inactivation pharmacologique de l'activité cérébrale, qui ne sont pas compatibles avec une approche chez le sujet humain. D'une durée de 5 ans, il nécessitera l'utilisation de 48 rats male Long-Evans adultes, répartis en quatre groupes. Le rat représente le modèle de choix pour les études du comportement spatial qui est à la base des protocoles comportementaux qui seront utilisés.

Un premier groupe de 12 animaux non opérés sera utilisé pour la mise au point et la validation du protocole comportemental. Puis trois autres groupes de 12 animaux chacun seront opérés pour être implantés avec des canules d'injection intracérébrale et testés dans le protocole comportemental mis au point et validé auparavant. Un groupe sera implanté dans l'hippocampe dorsal, un autre groupe sera implanté dans le cortex préfrontal médian, tandis que le dernier groupe sera implanté dans le striatum dorsomédian. Les effets comportementaux d'inactivations transitoires et réversibles de chacune de ces trois structures seront ensuite évalués grâce à l'injection intracérébrale soit de solution saline (PBS), sans action pharmacologique, soit de muscimol (un agoniste des récepteurs GABA qui entraîne l'inactivation de la structure-cible).

Chaque animal sera donc son propre contrôle, conduisant donc à la réduction du nombre d'animaux nécessaires pour la réalisation du projet. Afin de réduire la douleur, la souffrance et l'angoisse des animaux, ils seront hébergés dans des conditions standard et manipulés quotidiennement pour les habituer à l'expérimentateur. Ils seront également exposés aux dispositifs de tests comportementaux de façon répétée afin d'y être habitués. Les implantations chirurgicales de canules seront réalisées sous anesthésie générale. Après une période post-opératoire d'une semaine permettant aux animaux de récupérer, ils seront à nouveau manipulés quotidiennement pour toute la durée de l'expérience afin de les familiariser avec les différentes procédures. Ces étapes sont essentielles non seulement pour le bien-être des animaux mais également pour le bon déroulement de l'étude.

L'objectif général du projet est d'étudier le réseau cérébral de la navigation spatiale, qui permet de réaliser des comportements orientés vers un but. Ce réseau est composé d'un petit ensemble de structures jouant un rôle essentiel : 1) l'hippocampe dorsal (une structure importante pour la mémorisation et la représentation des événements futurs), 2) le cortex préfrontal médian (une région corticale importante pour la planification du comportement), et 3) le striatum dorsomédian (une région sous-corticale faisant partie des ganglions de la base et importante dans le contrôle de l'action).

Au cours des phases les plus précoces de l'apprentissage, la sélection de la réponse la plus appropriée repose un processus délibératif de simulation mentale des conséquences des différentes actions possibles. Dans un labyrinthe, ce processus chez le rat se traduit par un comportement particulier au point de choix (au moment de la sélection de l'action), appelé Vicarious Trial and Error (VTE). Ce comportement de VTE est caractérisé par des hésitations, des mouvements de la tête et des micro-choix au cours desquels l'animal n'entre que partiellement dans les voies du labyrinthe.

L'objectif de ce projet est d'étudier en détail ce comportement grâce à une approche comportementale à haute résolution et de tenter de déterminer le rôle de chacune des composantes cérébrales du réseau (hippocampe, cortex préfrontal médian et striatum). Il s'agira de mesurer l'impact d'inactivations intracérébrales ciblées et transitoires sur les différents aspects des VTE et sur la performance comportementale. L'objectif plus ambitieux de ce projet est de valider, chez le rongeur, un modèle animal des processus de prise de décision et de leur dynamique au cours de l'apprentissage, permettant ainsi d'élaborer des hypothèses sur le fonctionnement de ces processus chez le sujet humain.

10297 La radioimmunothérapie est une méthode thérapeutique consistant à injecter au patient atteint d'un cancer une substance radioactive capable de reconnaître les cellules cancéreuses grâce à la vectorisation des molécules via un anticorps permettant ainsi leur destruction. Les radionucléides utilisés classiquement en clinique sont des émetteurs beta moins (strontium, yttrium, iode). Depuis quelques années, le recours à des radionucléides à émission alpha (ou alphathérapie) revêt un caractère particulièrement intéressant du fait de la forte énergie libérée et de son parcours très court (100 µm contre 2 à 3 mm pour des émetteurs beta) permettant ainsi une destruction ciblée des cellules cancéreuses tout en limitant la destruction des cellules saines avoisinantes.

Ce projet a pour but de réaliser des études précliniques sur trois pathologies onco-hématologiques différentes avec un nouveau radionucléide à émission alpha et à courte durée de vie couplé à des anticorps monoclonaux (différents selon les pathologies étudiés) et utilisera au total 2550 animaux sur une durée de 4 ans.

Ces études précliniques se déroulent selon trois phases. Les études de biodistribution du médicament permettent d'observer la distribution du médicament au sein de l'organisme. Les études de toxicité permettent d'observer une éventuelle toxicité du médicament et donc de trouver les doses pouvant être injectées à l'animal présentant une tumeur. Enfin, l'étude d'efficacité permet d'évaluer l'efficacité du médicament et de déterminer la méthode d'injection et la dose adéquate. Ces études seront réalisées sur des modèles murins, modèle utilisé au laboratoire et pour lequel nous disposons de connaissances nous permettant d'appréhender les résultats qui seront obtenus. Ce projet expérimental répond aux exigences de la règle des 3R, à savoir :

Remplacer : les modèles in vitro permettent de réaliser la preuve de concept d'efficacité de ciblage du médicament testé. Cependant, ils ne permettent pas de modéliser la complexité de la réponse d'un organisme vis-à-vis d'un nouveau médicament. Les études précliniques sont une étape obligatoire avant le passage en clinique.

Réduire : afin de limiter le nombre d'animaux utilisés dans ces études deux types d'imagerie seront utilisées dans ce projet pour répondre aux questions de biodistribution du médicament d'une part (imagerie nucléaire) et pour suivre et monitorer la progression tumorale via l'utilisation de cellules exprimant la luciférase (imagerie optique). Ainsi l'utilisation de l'imagerie in vivo permet de réaliser un suivi longitudinal limitant le nombre d'animaux utilisés dans le cadre de ces études précliniques.

Raffiner : les animaux sont élevés dans des conditions d'hébergement qui respectent leur bien-être (température et hygrométrie contrôlées ; densité d'animaux en lien avec la vie grégaire de la souris, présence d'enrichissement, change régulier de la litière, nourriture et eau ad libitum, surveillance quotidienne de l'état général des animaux). De plus, l'ensemble des procédures sera réalisé de manière à limiter le stress et la souffrance des animaux et la définition de critères d'arrêt permettra de mettre un terme à l'expérimentation si nécessaire.

10298 Les chocs électriques sont nécessaires afin de réduire certains troubles du rythme cardiaques létaux chez l'homme. Chez les patients à haut risque, ces chocs sont délivrés par des appareils directement implantés, les défibrillateurs automatiques implantables (DAI). Il est démontré que les patients recevant des chocs électriques ont un taux de mortalité totale plus élevé. Il existe donc un effet délétère, "toxique", direct ou indirect, des chocs électriques sur le muscle cardiaque, le myocarde. Il n'existe actuellement aucune donnée physiopathologique sur les mécanismes sous-jacents à cette toxicité. Il n'existe aucune donnée sur des toxicités éventuellement différentes selon l'énergie utilisée, le vecteur de cette énergie, le nombre de chocs délivrés, ou la maladie éventuelle du muscle cardiaque sous-jacent. La connaissance de ces mécanismes permettrait d'établir de nouvelles stratégies, notamment techniques, pour diminuer les effets délétères de ces chocs électriques internes, vitaux chez certains patients à risque.

L'objectif de cette étude est donc de mesurer la toxicité des chocs électriques chez l'animal (cœur de bœuf), grâce à des études de la métabolomique et de la protéomique cardiaques, après implantation d'un appareil de défibrillation automatique, dans différentes conditions expérimentales (cœur sain et cœur avec insuffisance cardiaque, à différentes énergies de défibrillation, dans différents modes de défibrillation). Un total de 10 animaux par groupe expérimental et 4 groupes sont prévus : groupe contrôle, groupe avec choc endocavitaire, groupe avec choc inapproprié, groupe avec choc sous-cutané, groupe avec orage rythmique.

Le principe des "3 R", remplacement, réduction et raffinement, sera prioritaire.

Le raffinement comprendra une anesthésie générale pour toutes les procédures avant même la mise en salle de bloc opératoire et jusqu'à euthanasie de l'animal. Les bœufs sont hébergés en groupes sociaux sur litières de paille avec du foin de qualité. Les animaux resteront en groupe pour les mises à jeun afin d'éviter tout stress.

Une première analyse statistique après l'étude sur 2 animaux (contrôle et choc endocavitaire) permettra de réduire éventuellement le nombre total d'animaux (résultats très significatifs) ou de mettre un terme à l'expérimentation.

Le remplacement par une procédure in vitro ou in silico n'est pas réalisable du fait de la nécessité d'appliquer les chocs à un organe entier in vivo.

10299 Les neuropathies périphériques induites par la chimiothérapie (NPICs) sont des neuropathies à prédominance sensitive, à l'origine de douleurs. Aujourd'hui, la seule prévention reconnue contre les NPICs repose sur le dépistage des neuropathies préexistantes et sur la détection précoce de signes cliniques chez des sujets soumis à une chimiothérapie neurotoxique. Prévenir les NPICs et leur développement par une thérapeutique appropriée est une priorité pour assurer le maintien et l'efficacité des traitements anti-cancéreux et améliorer la qualité de vie des patients. Le modèle animal, en tant que système intégré, reste donc le choix obligatoire pour étudier la douleur induite

par la chimiothérapie. Les modèles animaux de NPICs présentent les avantages ; de se rapprocher de la clinique humaine et d'être peu invasifs pour l'animal.

Pour étudier l'effet de molécules présentant des propriétés neuroprotectrices et/ou neurorégénératrices, nous développons 3 modèles murins de neuropathie induite par la vincristine (VCR), l'oxaliplatine (OXP) et le paclitaxel (PTX), trois agents anticancéreux neurotoxiques représentant la classe des alcaloïdes de la Pervenche, des sels de platine et des taxanes.

Axe 1 :

Une analyse fonctionnelle et morphologique sera réalisée pour caractériser le développement des NPICs. Le degré de gravité et la cinétique de la neuropathie seront évalués à l'aide de tests comportementaux les heures suivant l'injection de l'agent anti-tumoral pour l'OXP et une semaine, 14 et 21 jours après les injections pour la VCR, l'OXP et le PTX. Seuls des tests d'évitements seront utilisés pour l'évaluation de la douleur, et les stimuli seront appliqués au seuil de la douleur et non au-delà. Les tests choisis permettront la détection d'une allodynie ou d'une hyperalgésie mécanique et l'évaluation de la réponse nociceptive au chaud, au froid et à une pression mécanique. Une étude électro physiologique sur nerf sciatique évaluera l'atteinte axonale : vitesse et d'amplitude de conduction nerveuse. Les animaux seront profondément anesthésiés pendant les mesures d'électrophysiologie puis mises à mort. 6 groupes de 10 animaux seront utilisés.

Les effets préventifs ou curatifs du C21 et 3 autres molécules constituant le PXT3003 sur les neuropathies induites par la VCR, l'OXP ou le PTX seront évalués à l'aide des mêmes tests. Ces travaux seront la base pour la mise en place de futurs essais cliniques chez des patients sous chimiothérapie neurotoxique.

Axe 2 :

Le C21 agit en tant qu'agoniste du récepteur de type 2 de l'angiotensine II. Dans une étude pilote, la stimulation directe des AT2R par le C21 a prévenu le développement de la neuropathie induite par la VCR. Le risque que le C21 ne présente pas d'effet bénéfique sur le développement des neuropathies induites est limité au vue des précédents résultats obtenus. Les futurs résultats apporteront des éléments nouveaux sur l'implication du récepteur AT2R dans la régulation de la douleur associée aux NPICs. Pour l'Axe 2, 4 groupes de 10 animaux seront utilisés soit 80 animaux au total. Le nombre de 10 animaux par groupe pour Axes1 et 2 a été calculé à partir de résultats (moyenne et écart-type) obtenus lors de l'étude pilote sur le modèle de neuropathie induite par la VCR et traité au C21. Les animaux utilisés pour l'Axe 1 serviront de contrôle pour l'Axe 2.

Axe 3 :

Le PXT3003, est un ensemble de 3 molécules (le RS-baclofen (1), l'hydrochloride de naltrexone (2) et le D-sorbitol (3)), développé par Pharnext. La combinaison des molécules du PXT3003 améliore la sensibilité à la chaleur, les paramètres d'électrophysiologie et d'histologie des nerfs périphériques chez le rat et le patient atteint Charcot-Marie-Tooth 1A (CMT1A), neuropathie héréditaire. Administré 30 minutes après un écrasement du nerf sciatique de souris, il accélère la neurorégénération du nerf sciatique. L'objectif de l'Axe 3 est d'évaluer, l'effet bénéfique possible du PXT3003, en préventif ou en curatif, sur les neuropathies périphériques induites par la VCR, l'OXP et le PTX, ainsi que les effets respectifs de chacune des molécules qui le composent (1 ou 2 ou 3), et les effets synergiques des combinaisons de molécules; 1+2, 1+3, 2+3. Pour l'Axe 3, 4 groupes de 6 animaux seront utilisés pour chaque traitement en préventif et en curatif, soit $24 \times 7 \times 2 = 336$ animaux. Les animaux utilisés pour l'axe 1 serviront de contrôle pour l'axe 3.

Le nombre d'animaux total pour l'ensemble du projet est de 476.

Il n'existe, à ce jour, aucune méthode alternative à l'expérimentation animale disponible qui reproduit l'ensemble des mécanismes mis en jeu à la génération d'une douleur induite par des cytotoxiques anticancéreux. En effet, les modèles in vitro ne permettent pas de modéliser la complexité de la réponse d'un organisme entier face à l'administration d'agents de chimiothérapie. Les animaux seront élevés dans des conditions d'hébergement (température et hygrométrie de l'environnement, densité d'animaux, présence systématique d'enrichissement, change régulier de la litière, nourriture et eau ad libitum, surveillance quotidienne de l'état général des animaux) qui respectent leur bien-être. Les expérimentations seront réalisées par du personnel formé à l'expérimentation animale dont deux de niveau "concepteurs". De plus, l'ensemble des procédures sera réalisé de manière à limiter le stress et la souffrance des animaux (anesthésie, tapis chauffant pendant les mesures

d'électrophysiologie, détermination d'une limite haute au-delà de laquelle l'animal sera soustrait au stimulus pour les tests à la douleur).

10300 Notre laboratoire développe depuis de nombreuses années des modèles murins transgéniques permettant l'étude d'un groupe de pathologies, les maladies de dépôt d'immunoglobulines monoclonales, qui viennent gravement compliquer plusieurs maladies hématologiques tel que le myélome multiple. Le pronostic vital des patients est souvent très péjoratif du fait de ces complications. Ces maladies se caractérisent par le dépôt de tout ou partie d'un anticorps monoclonal qui est produit en excès lors d'une prolifération plasmocytaire monoclonale. Les dépôts peuvent se localiser dans différents organes, notamment le rein, et conduire à leur défaillance.

En lien les médecins en milieu hospitalier, nous souhaitons développer des modèles murins qui sur expriment tout ou parties de ces anticorps humains pathogènes isolés de patients. Le but de ces modèles est d'étudier les mécanismes physiopathologiques de développement de ces maladies, d'étudier l'évolution de la fonction des organes touchés et de développer et/ou de tester des thérapies innovantes lors d'essais précliniques en vue de leur transposition chez les patients.

Dans un premier temps, nous allons générer 6 lignées qui représente les formes les plus fréquentes ces pathologies. Ces 6 lignées vont être générées par transfection de cellules souches embryonnaires murines puis micro injections des cellules modifiées dans des blastocytes de souris puis réimplantations dans des femelles pseudo-gestantes, selon la méthode de référence de transgénèse.

Une fois les animaux générés, nous souhaitons dans un premier temps évaluer le niveau d'expression du gène que nous aurons inséré sur des prélèvements sanguins, puis étudier la fonction des organes potentiellement ciblés par les dépôts d'immunoglobulines par divers dosages biochimiques sur des prélèvements sanguins et urinaires. Une fois ces procédures réalisées, les organes de ces souris seront prélevés sur les animaux euthanasiés afin de réaliser une analyse des lésions histologiques sur différents tissus, notamment le rein. Quelques animaux seront également euthanasiés afin de récupérer différentiellement les glomérules et les tubules rénaux afin d'en étudier le transcriptome.

Enfin, si les modèles sont pertinents pour les pathologies ciblées, la finalité de ces modèles, outre le fait d'élucider les mécanismes physiopathologiques conduisant aux lésions observés, est de tester diverses approches thérapeutiques sur ces modèles, dont plusieurs molécules sont en cours de développement. La présence de modèles animaux permettrait de valider ou non le bénéfice de la molécule et de potentiellement la proposer à terme aux patients.

L'ensemble de ce projet va nécessiter l'utilisation de 2006 souris. Ce projet répond aux exigences des 3R :

- Remplacement : les modèles cellulaires ne permettent pas de reproduire la complexité de la pathophysiologie des maladies de dépôts qui peut varier par le nombre et la localisation des atteintes d'organes, et ne permettent pas non plus de reproduire l'incidence d'une défaillance d'organe sur un autre organe ou l'organisme dans son entier. D'autre part, les approches thérapeutiques que nous souhaitons tester ont principalement pour objectif de cibler les dépôts d'immunoglobulines et de vérifier les réponses organes. Des modèles murins pour certaines maladies de dépôts ont déjà été développés par le passé et ont permis d'atteindre les objectifs précédemment évoqués.

- Réduction : Nous avons déjà développé ce type de modèle et bénéficions donc du recul et de l'expérience nécessaire pour limiter les besoins en animaux car de nombreuses expériences sont déjà au point. Nos procédures sont peu invasives, ce qui nous permet de réaliser un maximum d'expériences sur un minimum d'animaux.

- Raffinement : Les animaux sont élevés dans des conditions d'hébergement qui respectent leur bien-être (contrôle de la température et de l'hygrométrie de l'environnement, densité d'animaux, présence d'enrichissement, change régulier des litières, eau et nourriture à volonté, surveillance quotidienne des animaux). Toutes les procédures sont réalisées de façon à limiter le stress et la souffrance des animaux (anesthésies, tapis chauffant pendant la chirurgie, analgésie post opératoire, acclimatation progressive des animaux aux cages métaboliques).

10301 La réglementation en matière d'expérimentation animale impose une formation à toute personne manipulant des animaux dans ce cadre. Cette formation doit inclure des travaux pratiques sur animal vivant. Les travaux pratiques décrits répondent donc à cette exigence réglementaire. Ils ont pour objectif de sensibiliser les stagiaires et de les former à la manipulation des souris et des rats dans le respect de l'animal mais aussi de leur apprendre les bons gestes techniques. Cela permet à terme de garantir leur bonne exécution en situation professionnelle et contribue ainsi au respect du bien-être animal.

Une séance de travaux pratique avec les souris et une séance avec les rats seront suivies par chaque stagiaire. Pour chaque animal des injections de sérum physiologique sont réalisées sur animal vigile puis l'animal est anesthésié et des injections ainsi que des prises de sang sont effectuées sous anesthésie générale. Au maximum, 144 personnes sont formées par an, ce qui nécessite 48 rats et 48 souris par an. Un maximum de 240 rats et 240 souris sont nécessaires pour 5 ans de formation.

Les principes de remplacement, de réduction et de raffinement ont guidé la définition du programme de ces travaux pratiques :

Remplacement :

Pour préparer au mieux les stagiaires, des cours théoriques sont dispensés avant la réalisation des travaux pratiques pour former et sensibiliser les stagiaires. De plus, les stagiaires suivent deux séances de travaux pratiques sur animaux factices (en utilisant des mannequins de rongeurs) pour apprendre les méthodes de contention et d'abord de l'animal sans utiliser d'animaux. Néanmoins, il reste nécessaire en fin de formation de placer les stagiaires en situation réelle et de les former à l'abord de l'animal vivant ; il s'agit d'une exigence du ministère de l'agriculture pour agréer la formation. Cela permet ainsi de garantir la qualité des gestes qui seront appliqués ultérieurement par les stagiaires aux animaux dans le cadre de leurs activités. La manipulation d'un rat et d'une souris étant différente, il est nécessaire de former les stagiaires aux particularités de chacune de ces deux espèces. En effet, les rongeurs représentant 65% des animaux utilisés en recherche en France en 2015, il paraît donc important de proposer des formations à la manipulation de ces deux espèces.

Réduction :

Afin de réduire autant que possible le nombre d'animaux sans leur imposer trop de contraintes, 1 souris et 1 rat sont utilisés pour 3 stagiaires. Ce sont des animaux de réforme (non utilisables pour de la recherche), ce qui évite de produire d'animaux pour les besoins de ces travaux pratiques.

Raffinement

La durée des travaux pratique est de 2h et chaque animal ne sert que pour une seule session. Le taux d'encadrement des stagiaires est important : 1 formateur pour 5 stagiaires et 2 animaux. Ainsi toute manipulation sera supervisée par une personne compétente. Les TP sur souris et sur rats sont organisées distinctement pour éviter la présence concomitante de ces deux espèces (ce qui est stressant pour les animaux). Le seul acte réalisé sur animal éveillé est l'injection de liquide physiologique, ce qui n'est pas douloureux et n'entraîne aucune conséquence délétère. Le choix du matériel est fait avec précaution et le volume de solution injectée est faible. Les autres gestes techniques se déroulent sous anesthésie générale sans réveil ; les animaux ne subissent ainsi ni stress ni douleur ; par ailleurs le volume de sang prélevé est faible. Si malgré toutes nos précautions un animal présente des signes de stress ou de douleur marqués, il est immédiatement euthanasié par une méthode indolore.

10302 Les principaux traitements utilisés pour lutter contre les cancers sont la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie, l'hormonothérapie, seuls ou combinés. Cependant ces dernières années, l'émergence de l'immunothérapie (stimulation du système immunitaire contre les cellules cancéreuses) a permis de développer une autre approche thérapeutique moins « pénible » pour le patient. Ces traitements ont montré des effets bénéfiques dans plusieurs formes de cancers comme le cancer du sein, les cancers des poumons, le mélanome. Cependant, certains patients ne répondent pas à ces traitements. De nombreuses études ont montré que les cellules T régulatrices (Treg) sont un frein au développement des réponses immunitaires anti-tumorales, et pourrait expliquer cette résistance thérapeutique. Le contrôle de la fonction de ces cellules pourrait alors

permettre d'augmenter l'efficacité de ces traitements. Dans ce contexte, la manipulation de la signalisation du récepteur des lymphocytes T représente une cible prometteuse. L'objectif de ce projet de recherche vise à déterminer si la perturbation de l'activité des Treg via deux molécules candidates, favoriserait le développement d'une réponse immunitaire anti-tumorale efficace. Pour cela, nous utiliserons 2 modèles expérimentaux de cancers chez la souris : un modèle de mélanome par implantation de la lignée tumorale B16 en sous-cutané ; un modèle de mélanome métastatique pulmonaire par injection intraveineuse de la lignée tumorale B16. Nous utiliserons des souris génétiquement modifiées pour les molécules cibles comme sources de cellules T.

Pour l'ensemble du projet, il est prévu d'utiliser un maximum de 1434 animaux sur 5 ans.

La règle des 3R sera appliquée dans le cadre de ce projet.

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

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

3-Raffinement : Les conditions d'expérimentations font l'objet d'une procédure de suivi du bien-être animal. Les animaux seront suivis quotidiennement à l'initiation du modèle. Ils seront tous sacrifiés entre le 15ème et 20ème jour du début de l'expérimentation sauf si un animal présente un des points limites d'arrêt de la procédure, que nous aurons définis pour limiter la douleur, la souffrance ou l'angoisse de l'animal (perte de poids, aspect et taille de la tumeur, comportement, ...). Dans ce cas, tous les animaux seront euthanasiés avant le terme de la procédure. De plus, les personnes responsables du projet ont été formées à l'utilisation des animaux à des fins scientifiques ; elles garantissent la formation et de l'encadrement des autres expérimentateurs impliqués dans les procédures expérimentales. L'apprentissage et la maîtrise des gestes techniques sont reportés dans les livrets de compétences des personnes concernées.

10303 Les animaux utilisés dans ce projet correspondent à des modèles d'étude du cancer du pancréas pour lequel aucun traitement efficace n'est à l'heure actuelle disponible et qui est le 4ème cancer le plus mortel. Quatre-vingt-quinze pour cent des patients diagnostiqués sont décédés à 5 ans, qu'ils aient été opérés ou non et l'incidence de ce cancer est en hausse (en 2010 = 7800 nouveaux cas / an). Il s'agit donc d'une pathologie de santé publique. Comprendre la résistance aux traitements est un axe de recherche qui devrait permettre d'améliorer ce terrible pronostic.

Des études récentes, dont les nôtres, démontrent que l'inaccessibilité des drogues à la tumeur serait au moins en partie responsable de l'absence d'effet thérapeutique des chimiothérapies dans ce cancer, et ce du fait d'une très faible vascularisation de ces tumeurs. Cette faible vascularisation serait la conséquence d'une fibrose (la transformation du tissu en un tissu composé de fibres). Pour mimer la pathologie humaine, nous avons besoin de modèles murins la reproduisant, et il s'agit des modèles transgéniques qui sont les modèles les plus reproductibles de la pathologie humaine (souris avec système immunitaire fonctionnel) ou des modèles de greffe d'échantillons de tumeurs humaines dans des souris dont le système immunitaire n'est pas fonctionnel (Patient-Derived Xenograft, PDX). Les tumeurs greffées comprennent la tumeur humaine dans son hétérogénéité cellulaire et moléculaire (1 PDX pour 1 tumeur humaine pour laquelle nous pouvons avoir les données cliniques associées au patient). Pour l'étude plus spécifique de l'implication de gènes dans les échanges cellules cancéreuses pancréatiques et cellules du microenvironnement, des modèles murins où ces cellules sont implantées dans le pancréas sont indispensables pour reproduire dans l'organe la tumeur dans toute son hétérogénéité et les échanges tumeur / organisme hôte, qui vont déterminer la progression tumorale, métastatique et la réponse aux traitements. Ces expériences ne peuvent être réalisées que directement chez l'animal car les interactions cancer / microenvironnement (réaction fibreuse) / réaction de l'hôte ne peuvent pas encore être mimées in vitro. Le respect de la règle des 3R sera appliqué dès que possible en remplaçant les études sur

les modèles murins par des expérimentations réalisées sur des cultures de cellules isolées de nos modèles murins, qui peuvent être maintenues plusieurs semaines en culture et permettront de valider nos résultats tout en réduisant le nombre de souris à inclure dans les protocoles; d'autre part, étant donné que les souris transgéniques sont incluses dans les protocoles au fur et à mesure de leur génotypage, une analyse statistique continue de nos résultats permettra de stopper l'inclusion de nouveaux animaux dans les protocoles ainsi raffinés dès que ces analyses atteindront la relevance statistique. Une évaluation quotidienne de l'état clinique des souris sera réalisée afin de s'assurer de leur bien-être. En fonction des expérimentations et pour éviter la souffrance des animaux (douleur supérieure à celle d'une pique d'aiguille), les souris seront anesthésiées à l'isoflurane (3% en masque - inhalation constante), traitées avec des analgésiques (buprénorphine à 0.05mg/kg, ou kétamine-xylazine 80 / 5 mg/kg.). Lorsque les points limites seront atteints (perte de poids supérieure à 20%, volume tumoral >2cm³ ou état de choc, léthargie, inconscience ou immobilité de l'animal) les animaux seront euthanasiés (Pentobarbital 160 mg/kg i.p. plus dislocation cervicale). Il s'agit d'un projet d'équipe d'une longueur estimée à 3 ans, avec utilisation de 240 souris transgéniques, 580 souris immunodéprimées et 800 souris de fond génétique C57/Bl6.

10304 Dans le cadre des enseignements des Facultés de Médecine et Pharmacie est proposée une formation théorique et pratique intitulée « Initiation à l'expérimentation animale ». Cet enseignement est proposé chaque année à un nombre limité d'étudiants de troisième et quatrième cycles universitaires (une vingtaine au maximum par année). Ces étudiants sont engagés dans un parcours professionnel en relation avec la recherche expérimentale préclinique et clinique. L'unité d'enseignement « Initiation à l'expérimentation animale » comporte à la fois des enseignements théoriques et pratiques. Les enseignements théoriques portent sur les aspects réglementaires et bioéthiques, la notion de modèle animal, les apports de l'utilisation d'animaux à des fins expérimentales, des éléments de physiologie animale et de comportement animal, la manipulation des rongeurs, la notion de bien-être animal, les points limites en expérimentation animale, la règle de 3R, les alternatives à l'expérimentation animale, le fonctionnement et la visite d'une animalerie conventionnelle, le fonctionnement d'une animalerie EOPS. Les enseignements pratiques sont composés de 3 séances de 3 heures de Travaux Pratiques. Le Rat est l'espèce animale retenue pour ces TP. Celle-ci a été choisie en raison de sa taille, qui est la plus petite permettant à des néophytes de s'initier aux techniques opératoires chez le rongeur. Ce projet pédagogique utilise 160 rats sur une période de 5 ans (soit 32 animaux par an) et répond aux exigences de la règle des 3R, à savoir :

Remplacer : Les modèles in vitro ne permettent pas de modéliser la complexité de la réponse d'un organisme entier suite à l'administration d'une substance potentiellement thérapeutique. Les modèles animaux restent par conséquent couramment utilisés lors des études précliniques et cliniques. Les étudiants concernés par ces enseignements se destinent à des parcours professionnels dans ces domaines de recherche. Les méthodes alternatives à l'expérimentation animale sont décrites dans les enseignements théoriques associés à cette formation.

Réduire : Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés dans le cadre de ce projet pédagogique, cette formation n'est proposée chaque année qu'à un nombre limité d'étudiants. Ces enseignements remplacent les Travaux Pratiques de 2^{de} année seconde des Études Pharmaceutiques, qui ont été abandonnés en 2012 et nécessitaient l'utilisation d'une centaine de rats et d'une cinquantaine de grenouilles chaque année.

Raffiner : Les animaux sont élevés dans des conditions d'hébergement respectant leur bien-être (température et hygrométrie de l'environnement, densité d'animaux, présence systématique d'enrichissement, change régulier de la litière, nourriture et eau ad libitum, surveillance quotidienne de l'état général des animaux). De plus, l'ensemble des procédures sera réalisé de manière à limiter le stress et la souffrance des animaux (anesthésie générale, type anesthésique, tapis chauffant pendant l'anesthésie profonde, procédures sans réanimation).

10305 Le rôle du microbiote intestinal dans les mécanismes pathophysiologiques humains reçoit une attention toute particulière ces dernières années. En effet, le microbiote est l'ensemble des

microorganismes (virus, champignons et bactéries) qui vivent naturellement dans les intestins sans causer de problèmes particuliers. Ainsi plusieurs études chez l'homme ont montré des associations entre des microbiotes et la maladie de Parkinson. AMA-101 est une protéine uniquement synthétisée par les bactéries composant le microbiote intestinal. Une fois absorbée au niveau du tube digestif, AMA-101 se retrouve majoritairement au niveau du cerveau et sa carence entraîne une baisse de tétrahydrobioptérine, cofacteur intervient notamment dans la synthèse de dopamine. Ce résultat associé à d'autres données sur l'effet protecteur d'AMA-101 sur la mitochondrie et sur des modèles in vitro de la maladie de Parkinson ont conduit à tester l'efficacité d'AMA-101 sur un modèle rongeur de la maladie de Parkinson ou les neurones qui synthétisent la dopamine sont atteints. Il est intéressant de noter que AMA-101 et un de ses analogues structuraux ont déjà démontré leur efficacité in vivo sur un modèle rongeur de sclérose en plaques.

L'étude de la pharmacocinétique d'AMA-101 chez les mammifères nécessite d'aménager les protocoles classiques. En effet, comme la molécule est présente de façon endogène, il est donc nécessaire de diminuer au maximum l'exposition des animaux à AMA-101 pour mettre en évidence son activité. Un régime alimentaire dépourvu en AMA 101, l'empêchement de la coprophagie associée à la diminution de la quantité de microbiote intestinal par des traitements antibiotiques chroniques et/ou un régime gras sont deux solutions envisagées.

Le modèle de lésion unilatérale dopaminergique mime les déficits moteurs observés chez les patients Parkinsoniens à des stades avancés de la maladie. Ce modèle Parkinsonien chez le rat est obtenu grâce à l'injection de la neurotoxine 6-OHDA qui entraîne la mort sélective des neurones dopaminergiques. Deux semaines après la lésion, des tests comportementaux d'akinésie (tests d'initiation, du stepping et du cylindre) sont utilisés pour évaluer l'efficacité antiparkinsonienne des traitements testés. L'efficacité de l'administration de AMA 101 sera comparée à la L-DOPA représentant le traitement de référence. Dans le cas où le traitement est administré de façon préventive (avant la lésion dopaminergique), l'effet neuroprotecteur pourra être évalué en comptant le nombre de neurones dopaminergiques survivant après lésion dans les différents groupes expérimentaux. Pour cela, des études d'immunohistochimie à posteriori pourront être réalisées en marquant spécifiquement les neurones dopaminergiques (neurones tyrosine hydroxylase (TH) positifs). Ainsi le modèle de lésion dopaminergique par la 6-OHDA chez le rat apparaît comme un modèle plus élaboré, mimant la dégénérescence des neurones dopaminergiques observée dans la maladie de Parkinson ou l'efficacité d'AMA 101 peut être évaluée à la fois sur les symptômes moteurs Parkinsoniens mais également sur l'aspect de neuroprotection dans le cas où le traitement est préventif.

Ce projet va donc s'articuler en 3 étapes avec :

- une première étape de sélection des meilleures conditions de carence des animaux en AMA 101 mesuré au niveau du sang et du cerveau (n=18 rats)
- une étude pilote de test d'efficacité de AMA 101 au niveau symptomatique et neuroprotecteur dans un modèle de lésion dopaminergique unilatérale induit par la 6-OHDA chez le rat carencé en AMA101 (n=30 rats).
- une étude principale de test d'efficacité de AMA 101 au niveau symptomatique et neuroprotecteur dans un modèle de lésion dopaminergique unilatérale induit par la 6-OHDA chez le rat carencé en AMA101 (n=44 rats).

Pour la totalité de ce projet qui sera réalisé sur 3 ans, le nombre total d'animaux sera de 92 rats. Ce projet a été réalisé en association avec une société qui développe le candidat médicament AMA 101 et a été conçu pour utiliser le modèle préclinique adapté, limiter le nombre d'animaux utilisés dans le projet, limiter l'inconfort ou le stress généré tout en répondant aux problématiques posées. En effet, les chirurgies sont réalisées à l'aide d'un tapis chauffant, sous anesthésie chimique permettant une anesthésie adaptée à ce genre d'injection intracrânienne avec une couverture analgésique appropriée en administrant un agent anesthésiant au niveau local sur le trajet de l'ouverture cutanée et d'un agent morphinique empêchant l'installation de la douleur sur une longue durée (Environ 8h). Les animaux seront observés deux fois par jour, pendant la semaine qui suit la chirurgie et une injection sous cutanée de buprenorphine pourra être réalisée si besoin.

Les rats feront ensuite l'objet d'un suivi clinique quotidien pour palier tout inconfort ou signe de souffrance des animaux une grille d'évaluation des signes de douleur et d'inconfort.

10306 La maladie de Parkinson est une maladie neurodégénérative qui survient avec l'âge et qui affecte presque 8% des personnes de plus de 60 ans. La maladie se caractérise par une difficulté à initier les mouvements et s'avère très invalidante pour les patients et leur entourage. Un traitement existe pour cette maladie, la L-Dopa, mais elle occasionne des effets secondaires qui sont eux aussi très invalidants après seulement quelques années de traitement. Il y a donc des recherches actives pour trouver de nouveaux traitements permettant de freiner l'évolution de la maladie et ainsi en diminuer les symptômes. Dans ce contexte, notre laboratoire est expert dans l'étude de la nutrition comme un facteur primordial pour maintenir le cerveau en bonne santé et notamment prévenir les troubles neurodégénératifs avec l'âge. Dans la littérature scientifique, la vitamine A, une vitamine indispensable présente dans les produits animaux, apparaît comme pouvant jouer un rôle important dans la maladie de Parkinson, mais les mécanismes sont encore mal connus. Notre projet vise à analyser si une supplémentation en vitamine A peut prévenir la maladie ou en ralentir l'évolution. Pour cela, nous utiliserons des rats mâles de laboratoire que nous supplémenterons avec un régime enrichi en vitamine A. Nous modéliserons la maladie de Parkinson par une injection de toxine à un endroit précis du cerveau. Nous traiterons une partie des animaux avec la L-Dopa pour mesurer l'effet de la vitamine A sur les effets secondaires induits par ce traitement. Les capacités motrices des animaux seront évaluées tout au long de l'étude par des tests simples n'induisant pas de douleur. A la fin des expériences, les animaux seront euthanasiés pour étudier par biochimie, biologie moléculaire, histologie et électrophysiologie l'impact de la vitamine A sur la maladie de Parkinson. Cette études multi-approche apportera des connaissances importantes sur l'implication de la vitamine A dans la physiopathologie et l'étiologie de la neurodégénérescence liée à la maladie de Parkinson.

Ce projet est fondamentalement un projet de physiologie intégrée étudiant l'impact de la nutrition sur le fonctionnement cérébral, il n'existe donc pas de méthode alternative ou substitutive adaptée aujourd'hui. En effet, les cellules en culture ne forment pas de réseaux de neurones représentatifs de la réalité physiologique et nous n'avons pas encore suffisamment de données dans la littérature pour utiliser des modèles computationnels. De plus, les approches expérimentales sont trop invasives pour être effectuées chez l'Homme.

Un nombre de 10 animaux par groupe et par expérience a été déterminé comme étant le minimum requis pour atteindre une puissance statistique suffisante. Ainsi, 330 animaux seront utilisés au total sur une durée de 5 ans.

Les animaux seront hébergés par paire avec un congénère et ils bénéficieront d'un enrichissement comportemental dans leur cage. Leur état de santé sera vérifié quotidiennement et ils seront pesés une fois par semaine. Les animaux seront manipulés quotidiennement par les expérimentateurs pour réduire leur niveau de stress pendant les tests de comportement. Pendant les procédures chirurgicales, nous veillerons au bien-être des animaux en leur appliquant une sédation avant l'anesthésie et le début de la procédure (couverture 24h). Les animaux seront sur un tapis chauffant pendant toute la procédure, jusqu'au réveil de l'anesthésie. Avant le réveil, les animaux recevront une injection de sérum physiologique à 37°C pour les aider à récupérer plus vite de l'anesthésie. Les animaux seront surveillés deux fois par jour les 3 premiers jours suivant la chirurgie pour s'assurer de leur bonne récupération. Si des signes de douleur persistent après l'opération, ils recevront une dose d'anti-inflammatoire (couverture 24h), jusqu'à ce que les douleurs cessent.

Malgré toutes les précautions prises, si un animal présente des points limites à un moment de l'étude, comme une diminution du poids de plus de 20%, il sera euthanasié pour éviter toute souffrance.

Cette étude de recherche fondamentale apportera des connaissances importantes sur l'implication de la vitamine A dans la physiopathologie de la maladie de Parkinson et pourra ouvrir la voie à de nouvelles stratégies thérapeutiques pour traiter la maladie et/ou en ralentir la progression.

10307 La Trypanosomose Africaine, parasitose retrouvée en Afrique sub-Saharienne touche aussi bien les Hommes que les animaux. Dans les deux cas, les traitements anciens et non dénués de toxicité présentent de plus en plus de résistances. Or l'urgence de trouver de nouvelles thérapeutiques est immense devant les pertes humaines encore trop nombreuses et les pertes animales provoquant

des pertes bouchères et financières pour les populations. Pour répondre à cette problématique, notre équipe a ainsi développé des molécules chimiques dont la structure semble active en l'encontre des parasites responsables de cette maladie, les trypanosomes. Ces derniers, une fois transmis à l'hôte par la piqûre d'une mouche, se multiplient dans les différents fluides biologiques comme le sang et la lymphe et sont capables au bout d'un moment de franchir la barrière hémato-encéphalique (BHE) pour se retrouver au niveau du système nerveux central. Si l'individu n'est pas pris en charge, il décède. Nos molécules ont été testées in vitro sur une souche de parasite appelée *Trypanosoma brucei brucei* AnTat 1.9, afin d'évaluer leur activité et déterminer ainsi la concentration inhibitrice 50 qui tue 50% de la population des parasites. A cela s'ajoute des tests de cytotoxicité pour mesurer leur effet sur des cellules en culture. A la suite de ces tests, les meilleurs candidats au nombre de 4 molécules (sur plus d'une cinquantaine) peuvent passer en étude in vivo pour étudier leur efficacité sur un organisme vivant entier avec les contraintes qui lui sont propres (effet de premier passage hépatique, franchissement de la BHE, voie et temps d'élimination) mais aussi d'observer les éventuels effets indésirables qui ne peuvent pas être appréhendés totalement en culture.

Pour répondre à cette problématique, ce projet utilise au total 230 souris.

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

Remplacer : Les modèles in vitro ne permettent pas de modéliser la complexité de la réponse immunitaire d'un organisme entier face à l'administration de thérapeutiques, l'impact de la voie d'administration et l'efficacité totale d'un composé face aux processus de métabolisation et d'élimination de l'organisme. Ils sont aussi insuffisants pour envisager des essais cliniques chez l'Homme. Lorsque tous les tests in vitro (activité, toxicité, pharmacocinétique) ont été réalisés, le modèle murin validé pour cette pathologie permet au mieux de mimer les phénomènes observés chez les autres animaux ainsi que l'Homme.

Réduire : Le modèle d'étude est maîtrisé par l'équipe et le responsable du projet, ce qui permet de limiter les étapes de mises au point. De plus s'agissant d'une étude pilote, le nombre d'animaux utilisé est revu à la baisse pour pouvoir apprécier l'efficacité des molécules testées tout en utilisant qu'un faible nombre d'animaux. La souris est l'espèce modèle la plus adaptée pour ces études précliniques.

Raffiner : Les animaux sont élevés dans des conditions d'hébergement (température et hygrométrie de l'environnement, densité d'animaux, présence systématique d'enrichissement, change régulier de la litière, nourriture et eau ad libitum, surveillance quotidienne de l'état général des animaux) qui respectent leur bien-être. De plus, l'ensemble des procédures sera réalisé de manière à limiter le stress et la souffrance des animaux : anesthésie lors de l'administration de thérapeutiques, en l'absence de moyens efficaces pour prévenir une évolution de l'infection, les animaux seront euthanasiés dès l'apparition de signes de souffrance.

La ou les meilleures molécules répondant à l'ensemble de ces critères pourront alors être envisagées comme futurs traitements en médecine humaine ou vétérinaire.

10308 Les lymphocytes B (LB) sont capables de reconnaître une grande diversité d'antigènes (Ag) via leurs récepteurs pour l'Ag, BCR (récepteur des cellules B). Ce répertoire de reconnaissance est généré à partir des gènes situés sur les loci IgL et IgH, ce dernier étant localisé sur le chromosome 14 et codant les chaînes lourdes (IgH) des immunoglobulines (Ig) ou BCR. L'ADN G-quadruplex (G4) est une structure qui est abondante dans un nombre de promoteurs de gènes, dans des télomères et dans les régions switch (S) qui précèdent les gènes constants des chaînes lourdes des immunoglobulines. Au cours de la synthèse des anticorps, les lymphocytes B peuvent substituer l'isotype de l'immunoglobuline (Ig) (IgM ou IgD) vers d'autres classes d'Ig par un mécanisme appelé commutation de classe ou CSR (Class Switch Recombination) ou switch. Au cours du processus de CSR, la présence de G4 sur le brin d'ADN non template de la région S est nécessaire pour une recombinaison optimale. Des agents stabilisant des structures G4 sont proposés pour le traitement de cancer par leurs capacités d'inhiber l'activité télomérase mais l'effet de la stabilisation des G4 des régions S n'est pas connu. Une autre classe de molécules, les inhibiteurs de protéines à bromodomains (les protéines à bromodomains se lient aux histones de la chromatine associée, entre autres, aux régions enhanceurs nécessaires pour la transcription des gènes IgH) est utilisée

également dans le traitement de lymphomes. L'objectif de ce travail est de déterminer si ces agents pharmacologiques peuvent affecter la conformation des régions S et par conséquent la production d'autres isotypes d'immunoglobulines.

Ce projet utilise au total 295 souris qui répond aux exigences des 3R, à savoir :

Remplacer : Il n'y a pas des lignées cellulaires disponibles qui recombinent pour produire les isotypes d'immunoglobulines hautement inflammatoires tels que l'IgG et l'IgE qui ce qui nécessitent le recours à des souris. Les modèles in vitro ne permettent pas de modéliser la complexité de la réponse immunitaire d'un organisme entier. La souris est l'espèce modèle la plus adaptée du fait qu'il existe une très forte homologie de structure et fonction entre les loci IgH humain et murin faisant de la souris un modèle expérimental incontournable pour l'étude des dysfonctionnements immunitaires. L'études d'effets sur la prolifération cellulaire, de la production d'anticorps, l'expression des immunoglobulines de surface, et le recrutement des facteurs intervenant dans la commutation de classe ou la formation de centre germinatif ne peuvent pas non plus être faites sur des lignées cellulaires faut de production des anticorps de la classe étudiée.

Réduire : Toutes les molécules ont été évaluées précédemment chez la souris sans conséquence sur la santé des animaux dont certaines sont maintenant testés en phase clinique pour des tumeurs solides. Ceci élimine la nécessité de déterminer une dose toxique chez l'animal. Les expériences sont organisées dans un ordre précis, avec des témoins choisis de sorte à limiter la répétition d'expériences. Les manipulations sont réalisées de façon indifférente sur des mâles et des femelles, permettant ainsi une réduction du nombre d'animaux générés dans l'élevage. A la fin de l'expérimentation, les souris sont euthanasiées et tous les organes d'intérêt pour toutes les manipulations sont prélevés pour la suite de l'étude pour réduire la répétition des manipulations.

Raffiner : les animaux sont élevés dans des conditions d'hébergement (température et hygrométrie de l'environnement, densité d'animaux, présence systématique d'enrichissement, change régulier de la litière, nourriture et eau ad libitum, surveillance quotidienne de l'état général des animaux) qui respectent leur bien-être. De plus, l'ensemble des procédures sera réalisé de manière à limiter le stress et la souffrance des animaux (anesthésie, pommade ophtalmique).

10309 En dépit d'avancées considérables dans le traitement du cancer colorectal, les effets secondaires des thérapies actuellement utilisées restent très fréquents du fait du manque de préservation des tissus sains bordant la tumeur. De plus, la résistance aux thérapies anti-tumorales mais également l'importance des cas de récurrence restent des problèmes majeurs rencontrés. Pour pallier ces problèmes, la recherche médicale tend à développer des méthodes de thérapie focale du cancer colorectal et également, de comprendre et contrecarrer les phénomènes de résistance aux traitements qui peuvent se mettre en place. Dans le cadre de cette thérapie focale du cancer colorectal, la photothérapie dynamique (PDT) repose sur l'utilisation de molécules photosensibles appelées photo sensibilisateurs (PS). Après avoir ciblé spécifiquement les cellules cancéreuses, ces PS sont activés par la lumière et vont induire la production d'espèces hautement toxiques pour les cellules cancéreuses à l'origine de leur destruction. Ces effets oxydatifs sont donc confinés aux zones ayant à la fois accumulé le PS et ayant été soumises à l'irradiation.

La ligne directrice du laboratoire avec lequel nous collaborons est de synthétiser de nouveaux PS (complexes polypyridyl de ruthénium) capables de cibler spécifiquement les cellules cancéreuses afin d'optimiser l'effet thérapeutique. A partir de résultats in vitro déjà connus [1], ces PS seront évalués in vivo à partir de xénogreffes de cellules cancéreuses colorectales humaines à des souris immunodéprimées (25 souris réparties en 5 groupes correspondant à chaque condition de traitement). La finalité du projet étant de mettre en lumière une nouvelle molécule thérapeutique capable de stopper la prolifération tumorale en réduisant au maximum les effets secondaires.

Ce projet utilisera au total 25 souris et ce projet expérimental répondra aux exigences des 3R, à savoir :

Remplacer : les modèles in vitro ne permettent pas de modéliser la complexité de la réponse immunitaire d'un organisme entier face à l'administration de thérapeutiques et l'impact de la voie d'administration. Ils sont aussi insuffisants pour envisager des essais cliniques chez l'Homme. Les modèles murins de xénogreffes de cellules cancéreuses humaines sont bien décrits et permettent de mimer le phénomène observé chez l'Homme.

Réduire : le modèle de xénogreffes de cellules cancéreuses colorectales humaines à des souris immunodéprimées est maîtrisé par l'équipe et le porteur de ce projet, ce qui permet de limiter les étapes de mises au point. De plus, les expériences sont organisées dans un ordre précis, avec des témoins choisis de sorte à limiter la répétition d'expériences. La souris est l'espèce modèle la plus adaptée pour ces études précliniques et le couple modèle xénogreffes de cellules cancéreuses-PS thérapeutiques permettent d'envisager un effet anticancéreux pertinent.

Raffiner : les animaux sont élevés dans des conditions d'hébergement (température et hygrométrie de l'environnement, densité d'animaux, présence systématique d'enrichissement, change régulier de la litière, nourriture et eau ad libitum, surveillance quotidienne de l'état général des animaux) qui respectent leur bien-être. De plus, l'ensemble des procédures sera réalisé de manière à limiter le stress et la souffrance des animaux (anesthésie, tapis chauffant pendant la chirurgie, analgésique post opératoire).

10310 Afin de pouvoir assurer le diagnostic des maladies virales des porcs et des sangliers, il est nécessaire pour les laboratoires de disposer d'outils de caractérisation des pathogènes recherchés. Plusieurs pathogènes font en effet l'objet d'une surveillance en élevage de suidés ou chez les sangliers sauvages. Un sérum contenant des anticorps contre un agent pathogène spécifique est indispensable pour détecter et caractériser ce pathogène dans divers échantillons biologiques ou pour servir de sérum positif contrôle pour valider un test donné. Il pourra donc s'agir de sérums dits immuns ou hyperimmuns, selon leur mode d'inoculation (voie naturelle/voie intramusculaire répétée par exemple) dirigés contre différents virus de porcs. Pour cela, l'agent pathogène purifié ou provenant de prélèvements réalisés sur des animaux malades sera inoculé à des porcs indemnes de ce pathogène particulier. Ces porcs seront euthanasiés 3 à 14 semaines plus tard pour récolter un volume de sang important et nécessaire pour les applications indiquées ci-dessus. En outre, le suivi clinique des animaux et l'analyse de prélèvements réguliers permettront de définir les caractéristiques de l'agent responsable si elles sont inconnues à ce jour.

Nos procédures expérimentales seront menées dans le respect de la règle des 3R. Tout d'abord, l'estimation du nombre de porcs nécessaires est basée sur les activités récentes de notre laboratoire. En effet, en se basant sur un besoin annuel de deux nouveaux sérums vis-à-vis de deux virus représentatifs des maladies virales du porc, un maximum de 60 porcs devrait être nécessaire sur les 5 années de validité du projet. Malheureusement, aucune méthode alternative pour obtenir ce type de réactif n'existe car ce réactif ne peut être obtenu que sur l'espèce animale cible, le porc. Enfin, pour le raffinement, des mesures visant à assurer des conditions d'hébergement limitant l'anxiété potentielle des animaux (pas d'animal seul, accès à l'eau et à la nourriture à volonté, enrichissements de l'environnement par des jouets manipulables, présence de lampes chauffantes, ...) et à limiter la souffrance seront appliquées. Par ailleurs, si le sérum doit être produit vis-à-vis d'un virus fortement pathogène, il sera inactivé avant inoculation dans la mesure du possible. Quoiqu'il en soit, un soin particulier sera apporté au suivi clinique de chaque animal au quotidien. Ainsi des mesures basées sur des atteintes de points limites (réactivités des animaux à des stimuli, hyper- et hypothermies, pertes d'appétits et/ou pertes de poids sévères) ou l'apparition de douleurs ou de blessures sont prévues pour limiter la souffrance éventuelle des animaux.

10311 Un patient hospitalisé sur vingt contracte une infection nosocomiale. La principale source de contamination est le patient lui-même, et non l'environnement hospitalier : le patient est infecté par ses propres germes, présents dans son microbiote intestinal.

Les modèles animaux actuels pour l'étude du microbiote intestinal ne sont pas satisfaisants car trop éloignés de la situation naturelle.

Nous proposons un modèle murin innovant de transmission verticale (de la mère au nouveau-né) permettant l'implantation physiologique de bactéries, dans le but de tester de nouvelles approches thérapeutiques visant à limiter le portage intestinal de ces bactéries au pouvoir pathogène important. Ce modèle de transmission verticale de bactéries depuis la mère vers les souriceaux permet de mimer le véritable mode de transmission de la bactérie vers la descendance.

Une attention toute particulière est portée sur le nombre d'animaux utilisés dans le projet. Nous travaillons avec une compagnie spécialisée dans les biostatistiques. Cette collaboration nous

permet d'utiliser le nombre strictement nécessaire pour chaque expérience et de l'optimiser durant toute la durée du projet. Au total, nous estimons que 720 souris reproductrices (240 mâles et 480 femelles) seront nécessaires, sur une période de 5 ans. 5760 souriceaux approximativement devraient pouvoir ainsi être analysés. Soit au total 6240 animaux (les 240 mâles reproducteurs n'ont pas été comptabilisés, à la demande du ministère car ne sont impliqués dans l'étude qu'à des fins de reproduction). 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 chaque 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'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 n'occasionne qu'extrêmement rarement une réponse délétère pour l'animal. Tout animal présentant des signes de douleur, souffrance ou angoisse sera euthanasié.

10312 Les benzodiazépines constituent une classe de médicaments très utilisée en thérapeutique. La France est le deuxième plus gros consommateur de benzodiazépines en Europe derrière l'Espagne. En dehors des benzodiazépines à usage thérapeutique bénéficiant d'une autorisation de mise sur le marché et vendues en pharmacie, il existe des molécules appelées "nouvelles benzodiazépines de synthèse" (NBS) apparues en Europe depuis 2007. Elles sont commercialisées par des laboratoires clandestins de manière illicite (vente en ligne). Ces NBS sont consommées par certains toxicomanes qui les associent très souvent aux opiacés. De nombreux cas de décès en médecine légale observés chez les toxicomanes sont imputables à l'utilisation concomitante de ces NBS et de certains opiacés. Parmi les opiacés, l'oxycodone est utilisée en France pour traiter les douleurs de palier 3 d'origine non cancéreuse. Dans d'autres pays son utilisation est plus large pour des douleurs modérées. L'oxycodone entraîne une accoutumance puis une dépendance en cas de traitement prolongé ou d'usages détournés. Ainsi lorsqu'elle est mâchée ou écrasée puis injectée ou inhalée, elle provoque une euphorie semblable à celle d'une prise d'héroïne. Dans des cas de décès de toxicomanes, des analyses ont montré des concentrations plasmatiques anormalement élevées d'oxycodone associées à des NBS. Dans la série des NBS, le diclazépam est la molécule la plus retrouvée. Des études in vitro préliminaires ont montré que le diclazépam pouvait inhiber le métabolisme de l'oxycodone.

Cependant la pharmacocinétique et le métabolisme de ces NBS sont très peu documentés sur des modèles in vivo. Nous proposons d'utiliser un modèle animal pour démontrer le potentiel toxique de cette interaction dans le cadre d'une administration aiguë et subchronique. Le modèle souris en tant que système intégré présente des voies métaboliques similaires à celle de l'homme et ainsi permet de mener ces études. Nous proposons d'étudier l'interaction oxycodone/diclazépam sur le métabolisme de ces substances.

Ce projet nécessite l'utilisation de 72 souris swiss qui sont réparties en lots de 6 par groupe expérimental.

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

Remplacer : les modèles in vitro utilisant des microsomes hépatiques ne suffisent pas eux seuls pour modéliser et prédire la complexité des interactions métaboliques observées in vivo (organisme entier). Les modèles murins constituent une alternative permettant d'envisager les interactions métaboliques complexes chez l'homme.

Réduire : Nous utilisons des techniques de dosage performantes et très sensibles (spectrométrie de masse) permettant de détecter de très faibles variations des paramètres biologiques mesurés.

De plus le développement et l'utilisation rationnelle de modèles animaux est parfaitement maîtrisé par les personnes impliquées dans ce projet. Le nombre de souris par lots est réduit à 6 ce qui est le minimum pour des interprétations statistiques fiables.

Raffiner : les animaux sont élevés dans des conditions d'hébergement (température et hygrométrie de l'environnement, densité d'animaux, présence systématique d'enrichissement, change régulier de la litière, nourriture et eau ad libitum, surveillance quotidienne de l'état général des animaux) qui respectent leur bien-être. De plus, l'ensemble des procédures sera réalisé de manière à limiter le stress et la souffrance des animaux. Si le traitement chronique entraîne une altération de l'état général, un suivi plus approfondi des animaux (mesure du poids corporel, alimentation) sera réalisé.

10313 25% des patients atteints de cancer colorectal (CCR) nouvellement diagnostiqués présente des métastases, soit 10 500 patients selon les dernières données. Outre le foie, le péritoine est un autre site métastatique fréquent. Le traitement actuel des carcinomes péritonéaux coliques (CPC) est basé sur une cytoréduction complète associée à une chimiothérapie hyperthermique intrapéritonéale, encadrée par une chimiothérapie systémique. Cependant, ce traitement n'est accessible qu'aux patients présentant une CPC résécable. Or, la majorité des CPC sont considérées comme non résécables au moment du diagnostic.

L'objectif du projet « CarcinoPpulse » est de cerner l'utilité thérapeutique des effets d'impulsions de champ électrique nanoseconde dans le traitement de ces CPC. En effet, ces impulsions très courtes à hautes amplitudes sont déjà connues pour affecter et éradiquer un certain nombre de cancers superficiels (par exemple, de la peau), et elles ont l'avantage d'être sans douleur, sans effets secondaires connus et de cibler précisément les tissus. Elles sont actuellement en test clinique aux EU et en Europe dans des thérapies pour soigner le mélanome humain, et des études précliniques débutent sur le carcinome hépatocellulaire.

Aucune équipe n'a pour l'instant étudié l'effet des nsPEFs sur les nodules de CPC. Notre but est de déterminer si les impulsions de champ électrique nanoseconde peuvent aussi être efficaces sur des tumeurs solides in vivo et très résistantes aux traitements actuels classiques (type chimiothérapies et radiothérapies), pour lesquelles le pronostic vital des patients est engagé.

Il est primordial de vérifier dans un premier temps que ces impulsions n'affectent pas les tissus sains ni les vaisseaux sanguins, ce qui implique un passage expérimental du modèle cellulaire in vitro déjà développé dans notre laboratoire au modèle animal in vivo.

Nous prévoyons d'utiliser des technologies d'imagerie de pointe (bioluminescence, fluorescence en microscopie multiphotonique) afin de suivre l'influence de ces impulsions de champs électrique sur des tumeurs murines in vivo. Ainsi nous étudierons les modifications du micro-environnement tumoral, la dosimétrie, la nécrose, la mort tumorale, la taille et la vascularisation des échantillons en réponse aux traitements.

Dans un souci de réduction, nous avons déjà réalisé des études préliminaires par des techniques de culture cellulaire 2D in vitro de façon à limiter le nombre d'animaux et à remplacer au maximum les modèles. Il s'avère cependant nécessaire dans cette étude d'utiliser 200 jeunes souris divisées en différents sous-groupes expérimentaux selon plusieurs critères d'analyse (traitements, vascularisation, réponses moléculaires). La technique de microscopie envisagée permet le suivi de l'animal vivant, évitant son euthanasie pour l'observation de la tumeur. Les animaux en fin d'étude seront euthanasiés et le matériel biologique servira soit à des études de biologie moléculaire in vitro, soit à de l'histologie.

Le projet expérimental « CarcinoPpulse » utilise au total 200 souris et répond aux exigences des 3R, à savoir :

Remplacer : les modèles in vitro ne permettent pas de modéliser la complexité de la réponse immunitaire d'un organisme entier face à l'administration de thérapeutiques. Ils sont aussi insuffisants pour envisager des essais cliniques chez l'Homme. Les modèles murins de carcinome péritonéale sont bien décrits et permettent de mimer le phénomène observé chez l'Homme.

Réduire : le modèle de carcinome péritonéale est maîtrisé par l'équipe et le porteur de ce projet, ce qui permet de limiter des étapes de mises au point, déjà réalisées par le passé dans des laboratoires de renom. De plus, des expériences in vitro ont déjà permis de définir les valeurs seuil et dose-

réponse de la thérapie électrique sur les cellules de cancer colorectal murine. Celles in vivo sont organisées dans un ordre précis, avec des témoins choisis de sorte à limiter la répétition d'expériences. La souris est l'espèce modèle la plus adaptée pour ces études précliniques.

Raffiner : les animaux sont élevés dans des conditions d'hébergement (température et hygrométrie de l'environnement, densité d'animaux, présence systématique d'enrichissement, change régulier de la litière, nourriture et eau ad libitum, surveillance quotidienne de l'état général des animaux) qui respectent leur bien-être. De plus, l'ensemble des procédures sera réalisé de manière à limiter le stress et la souffrance des animaux (anesthésie, tapis chauffant pendant la chirurgie, analgésique post opératoire).

10314 Les agents pathogènes qui menacent la femme enceinte sont nombreux. Certains d'entre eux sont capables de traverser le placenta et causer des séquelles graves chez l'embryon. Ainsi, l'infection de la femme enceinte peut provoquer des altérations du développement placentaire et avoir des séquelles neurologiques graves chez le fœtus, ce qui constitue un problème de santé publique majeur.

Une particularité de la grossesse est la présence d'un grand nombre de cellules immunitaires. En condition physiologique, ces cellules participent activement au développement du placenta et à la tolérance du fœtus. Lors d'infection virale de la mère, ces cellules du système immunitaire peuvent acquérir de nouvelles fonctions afin d'empêcher la transmission du virus au fœtus. Cependant une réponse immunitaire exacerbée et non contrôlée pourrait très vite devenir délétère et participer au développement de maladies congénitales. De plus, une altération de la fonction des tissus infectés peut contribuer également à des complications sévères de la grossesse.

L'objectif global de ce projet est de mieux comprendre les modalités de l'infection du placenta par des virus et d'étudier ses effets sur la réponse immunitaire associée, le devenir de l'infection et le développement du placenta.

Vu les effets délétères et le coût exorbitant que peut générer l'infection de la femme enceinte, le recours à des modèles animaux est indispensable pour tacler cette problématique majeure de santé publique. Il n'existe aucun modèle cellulaire permettant de mimer le développement du placenta et de l'interface entre mère et fœtus. La souris reste donc le meilleur modèle d'étude pour comprendre comment les virus progressent de la mère vers l'enfant à naître et l'impact de l'infection sur le développement du placenta et du fœtus. La mise en œuvre d'un suivi quotidien du comportement général des animaux et l'application de points-limites, comme la perte de poids (si la perte de poids est supérieure à 20% du poids initial les animaux seront euthanasiés) permettent d'assurer le bien-être de l'animal. En maximisant les paramètres étudiés par souris, le nombre d'animaux sera réduit à minima pour chacune des étapes du projet. De plus, la disponibilité d'outils non négligeables permettra une analyse de la biologie fondamentale du développement du placenta et de la réponse immunitaire contre des agents infectieux. Etant donné que certaines de ces procédures peuvent entraîner la souffrance des animaux, nous allons mettre en place des moyens pour évaluer la souffrance des animaux et le cas échéant la diminuer. En particulier dans le cadre de la procédure d'implantation du placenta sous la capsule rénale, les animaux anesthésiés seront opérés sur un tapis chauffant. Au réveil, les animaux sont replacés dans des cages individuelles contenant du coton et de la nourriture sous forme de gelée afin de respecter le bien-être de l'animal. Le comportement de l'animal est surveillé quotidiennement (respiration, température du corps, prostration - déplacement dans la cage, prise de nourriture). Après récupération (2-3 jours), les animaux sont observés régulièrement plusieurs fois par semaine. Les animaux en détresse respiratoire, prostrés ou amaigris suite à la greffe, seront euthanasiés.

Nous prévoyons d'utiliser un nombre maximal de 828 souris sur 5 ans.

10315 Notre laboratoire fonde ses recherches dans l'étude de la réponse immune B et des lymphoproliférations avec différents objectifs :

- fondamentaux : mécanismes moléculaires régulant la production des anticorps / étude du remodelage génétique / biologie de la lymphomagenèse B et de la transformation tumorale / physiologie du lymphocyte B normal...

- appliqués à des questions de médecine expérimentale : réalisation de modèles mécanistiques d'étude des pathologies de l'immunité / participation à des travaux de recherche clinique / mise en place de nouveaux outils diagnostiques pour les lymphomes ;
- finalisés : approches visant notamment à l'amélioration du diagnostic ou du traitement de pathologies tumorales ou immunitaires / développements technologiques autour des méthodes de détection des cellules immunitaires...

Toutes ces études nécessitent l'utilisation de différents modèles murins dont le maintien, l'élevage et le génotypage sont décrits dans cette demande APAFIS. Ce projet comporte 2 procédures correspondant au maintien et à l'élevage de lignées de souris avec génotypage par biopsie de la queue et avec génotypage par prélèvement de sang. Le génotypage repose sur le prélèvement d'une petite quantité de sang et/ou de tissu sur chaque animal afin d'effectuer une analyse qui déterminera si les animaux sont bien porteurs des gènes souhaités pour la réalisation des études ultérieures.

Le choix de travailler avec des modèles murins repose sur le fait qu'il existe une très forte homologie de structure et fonction entre les loci IgH humain et murin faisant de la souris un modèle expérimental incontournable 1) pour l'étude des disfonctionnements oncogéniques aboutissant aux lymphoproliférations et 2) pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. L'émergence d'un lymphome tout comme la réponse immune B résultent des interrelations entre les diverses cellules (B, T, monocytes/macrophages) du système immunitaire, les divers organes lymphoïdes (rate, ganglions, moelle osseuse) et le vieillissement (l'incidence des lymphomes augmente avec l'âge) ce qui rend ces études impossibles in vitro sur cellules isolées.

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

- Remplacer : la réponse immune B et le développement des maladies lymphoprolifératives sont étroitement liés à la présence et à l'interaction de populations cellulaires et d'un microenvironnement adapté (cellules stromales de différents types, facteurs de croissance, chimiokines...). Ce mélange complexe n'est pas reproductible in vitro et c'est pourquoi le recours à des animaux vivants est indispensable pour pouvoir étudier ces mécanismes.
- Réduire : notre laboratoire possède une grande expérience dans l'élevage des lignées murines destinées à la recherche ce qui permet d'anticiper le nombre d'animaux reproducteurs nécessaires au maintien de chaque lignée ainsi que le nombre de portées nécessaires pour obtenir un nombre suffisant d'animaux pour effectuer les diverses expériences. Ce projet comprend un grand nombre d'animaux car il décrit l'ensemble des lignées de souris élevées par notre laboratoire pour une durée de 5 ans. Le nombre d'animaux produits est réduit au minimum afin d'être suffisant pour maintenir la lignée et effectuer les expérimentations ultérieures tout en évitant de produire des animaux inutilement. Ainsi, le nombre d'animaux utilisés pour ce projet sera de 6050.
- Raffiner : les animaux sont élevés dans des conditions d'hébergement (température et hygrométrie de l'environnement, densité d'animaux, présence systématique d'enrichissement, change régulier de la litière, nourriture et eau ad libitum, surveillance quotidienne de l'état général des animaux) qui respectent leur bien-être et favorisent leurs interactions sociales. De plus, l'ensemble des procédures sera réalisé de manière à limiter le stress et la souffrance des animaux : les prélèvements de sang et de tissus seront tous réalisés sous anesthésie générale gazeuse et par du personnel qualifié maîtrisant ces gestes. Les animaux sont maintenus sous surveillance jusqu'à leur réveil. L'observation régulière des animaux et le suivi de leur comportement permettra d'avoir un contrôle sur leur état de santé et tout animal présentant des signes de souffrance sera immédiatement euthanasié.

10316 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 mucopolysaccharidoses 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 mucopolysaccharidoses, la mucopolysaccharidose de type 1 (MPS1) peut prendre différentes formes : de sévère (syndrome de Hurler), intermédiaire (syndrome de Hurler-Scheie) à beaucoup plus légères (Syndrome de Scheie). La prévalence est estimée à 1/100 000, avec le syndrome de Hurler comptant pour 57% des cas, le syndrome de Hurler-Scheie pour 23% et le syndrome de Scheie pour 20%.

Des atteintes neurologiques aux déformations osseuses, les symptômes des formes sévères varient d'un patient à l'autre : retard mental, dysmorphie faciale : nez épaté, lèvres épaisses, front saillant, langue épaisse, yeux écartés, hydrocéphalie (excès de liquide dans le cerveau), ils apparaissent dans les premiers mois et l'espérance de vie est réduite, avec un décès avant l'adolescence du fait de graves complications cardiovasculaires et respiratoires. À l'autre bout du spectre, la forme atténuée de MPS1 se détecte généralement à l'âge adulte, la maladie affecte certains tissus : le cœur, les os, les articulations... les patients n'ont pas de retard mental, mais développent des maladies cardiaques ou des déformations osseuses.

Les atteintes oculaires, opacification de la cornée sont communes à toutes les formes, les glaucomes sont retrouvés plus fréquemment dans la forme atténuée. A ce jour, aucune méthode alternative ne permet de mimer l'oeil 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.

Notre but est d'étudier l'atteinte oculaire chez des souris portant la mutation responsable de la mucopolysaccharidose de type I et l'efficacité d'un médicament sur ces atteintes oculaires.

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 permettent de limiter une éventuelle douleur à son minimum. 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.

10317 La sclérose en plaques (SEP) est une maladie du jeune adulte qui représente la première cause de handicap sévère non traumatique chez les trentenaires. Elle touche approximativement 80 000 personnes en France dont les trois quarts sont des femmes. Cette maladie est caractérisée par la destruction de la gaine de myéline entourant les axones des neurones au cours de poussées d'inflammation cérébrale. La SEP est donc connue comme étant une maladie inflammatoire de la substance blanche qui contient le plus de myéline.

De nombreux éléments cliniques et radiologiques laissent penser qu'il existerait aussi une atteinte précoce de la substance grise (où se trouve le corps des neurones) avant même celle de la substance blanche.

Parmi les différents symptômes neurologiques induits par la SEP, l'altération de la mémoire (dépendante de l'hippocampe qui est une région particulière de substance grise) est fréquente et précède parfois l'apparition des autres déficits neurologiques. Cependant, il est impossible d'étudier les mécanismes biologiques qui conduisent à cette atteinte précoce chez l'homme chez qui on ne peut pas avoir accès au tissu lésé. Pour cela, nous utilisons un modèle de SEP chez la souris : l'encéphalite auto-immune expérimentale ou EAE.

Les travaux précédents réalisés au laboratoire ont montré que les déficits précoces de la mémoire dans ce modèle de SEP sont dus à une altération des neurones dans une région particulière de l'hippocampe (le gyrus denté) par les cellules immunitaires spécifiques du cerveau : les cellules microgliales.

Pour faire suite à ces travaux, nous souhaitons comprendre plus en détail les mécanismes cellulaires et moléculaires qui conduisent à une destruction des neurones du gyrus denté par les microglies. Pour cela nous planifions d'analyser l'effet d'inhibiteurs du système immunitaire sur les différents paramètres étudiés précédemment.

Nous étudierons à la phase précoce de la maladie chez ces animaux les caractères suivants :

- l'intégrité de la mémoire via un test comportemental

- l'intégrité des tissus en imagerie par résonance magnétique (IRM) et en microscopie après avoir marqué des cellules d'intérêt
- l'impact sur l'expression des gènes via deux techniques différentes : la première quantifie l'expression (qPCR) et la seconde localise cette expression (FISH)
- l'impact sur l'expression des protéines via un test qui permet leur quantification (test ELISA)
- l'intégrité fonctionnelle en électrophysiologie.

La règle des 3R sera appliquée de façon suivante :

Remplacement : il n'est pas possible pour l'heure de reproduire la complexité de la SEP avec des modèles in vitro. Il est donc nécessaire d'avoir recours à l'animal pour tester notre hypothèse.

Le modèle de sclérose en plaques chez la souris (EAE) est largement utilisé dans la littérature scientifique parce qu'il est celui qui reproduit au mieux les caractéristiques de la SEP retrouvées chez l'homme.

Réduction : Nous avons fixé une limite maximale à 448 souris pour une période de 5 ans. Il s'agit du nombre minimal d'animaux nécessaire à l'obtention de données de qualité exploitable et permettant une analyse statistique fiable. Les retombées scientifiques principales de ce projet seront une meilleure compréhension des mécanismes à l'origine de l'altération neuronale dans l'hippocampe affectant la mémoire au stade précoce de la SEP. A termes, ce projet pourra donc permettre d'identifier de nouvelles cibles moléculaires pour développer des traitements visant à protéger l'hippocampe et donc la mémoire des patients.

Raffinement : Des mesures de raffinements seront mises en place durant toute la durée du projet : les animaux seront hébergés au sein d'un établissement utilisateur agréé, dans des conditions d'hébergement favorisant leur bien-être (enrichissement, suivi quotidien par du personnel qualifié, alimentation au sol ...). Les procédures se déroulent sous anesthésie (isoflurane), et sur tapis chauffant, avec soins post-opératoires incluant l'administration d'analgésiques si nécessaire. Enfin des points limites ont été établis (décrits paragraphe 3.4.13), entraînant l'euthanasie anticipée de la souris si nécessaire.

10318 Le cytomégalovirus humain (CMVH) est la première cause d'infection congénitale virale avec une incidence de 1% des naissances. Il peut être responsable de graves troubles chez le nouveau-né infecté tels qu'une surdité ou un retard psychomoteur. L'infection du placenta précède toujours l'infection du fœtus. Elle peut être responsable à elle-seule de retard de croissance ou d'anomalies d'origine vasculaire par nécrose et inflammation placentaire. Elle peut aussi s'associer à des malformations congénitales en cas de franchissement de la barrière placentaire par le virus. Selon le terme, la perméabilité du placenta au virus et le risque de malformation cérébrale peuvent varier. Les malformations les plus graves survenant lorsque le fœtus est infecté au premier ou au deuxième trimestre de grossesse.

Aujourd'hui, aucun vaccin n'est disponible et les molécules couramment utilisées contre l'infection à CMVH ne peuvent être administrées à la femme enceinte du fait de leur toxicité. Compte tenu de la gravité des répercussions sur le fœtus de l'infection congénitale à CMVH, il est nécessaire de pouvoir évaluer le potentiel de nouveaux antiviraux dans un modèle in vivo, après avoir prouvé leur efficacité et leur innocuité dans des cellules ou des tissus en culture au laboratoire.

Le projet expérimental, qui utilisera au total 100 souris maximum, répond aux exigences des « 3R », à savoir :

Le modèle de tissus en culture est limité par l'absence de vascularisation et ne représente donc pas les conditions dans l'organisme. De plus, la stricte spécificité d'espèce du CMVH, ainsi que les différences de structures placentaires entre humain et animaux, font qu'il n'existe pas de modèle animal d'infection à CMV humain. Du fait de ces contraintes, le seul modèle pertinent est la souris immunotolérante greffée avec des tissus humains. (Remplacer) Nous allons greffer des explants placentaires humains dans ce modèle animal immunotolérant permettant ainsi une greffe facile tout en limitant les souffrances animales, et nous permettant d'introduire des molécules dans la circulation générale de façon à étudier leur devenir et leur efficacité dans un organisme complet.

Le but du présent projet de recherche est de vérifier la bonne vascularisation des greffons en sous-cutané et d'évaluer la cinétique de réplication de nos souches de CMVH en vue de n'utiliser que le strict minimum d'animaux lors des essais avec molécules dans le projet suivant. Pour cela, nous

avons réduit au strict minimum le nombre de souris à 100 animaux. Les jours de prélèvement des greffons infectés ont été définis d'après les résultats obtenus dans le modèle *ex vivo* afin de ne prélever que les jours les plus pertinents. Les procédures sont organisées dans un ordre précis, avec des témoins choisis de sorte à limiter la répétition d'expériences. (Réduire)

Les animaux sont élevés dans des conditions d'hébergement (température et hygrométrie de l'environnement, densité d'animaux, présence systématique d'enrichissement, change régulier de la litière, nourriture et eau *ad libitum*, surveillance quotidienne de l'état général des animaux) qui respectent leur bien-être. De plus, l'ensemble des procédures sera réalisé de manière à limiter le stress et la souffrance des animaux (anesthésie, tapis chauffant pendant la chirurgie, analgésique post opératoire). Tout animal présentant un signe de souffrance sera immédiatement euthanasié et le greffon sera extrait afin de procéder à son analyse. (Raffiner)

Nous espérons à la suite à ces études, identifier les molécules antivirales les plus efficaces et les moins toxiques capables de prévenir ou de limiter l'infection du placenta, et donc d'éviter l'infection congénitale ou d'en limiter les conséquences. La validation de ces molécules en *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo*, permettra de les proposer avec plus de pertinence chez la femme enceinte.

10319 Le cancer de la prostate est le cancer le plus fréquent chez l'homme dans les pays occidentaux et représente la 3ème cause de mortalité par cancer. La prise en charge de ce cancer pose deux problèmes. Lorsqu'ils sont diagnostiqués à un stade localisé dans la glande prostatique, il est important de pouvoir prédire quels cancers risquent de devenir agressifs. Lorsque que le cancer s'étend déjà au-delà de la glande prostatique, il est important de pouvoir traiter efficacement ces patients.

Le cancer se comporte comme un « parasite » de l'organisme et peut utiliser pour progresser les tissus normaux à proximité. Chez l'homme, la prostate est entourée d'un dépôt graisseux appelé tissu adipeux périprostatique (TAPP). La nature et le volume de ce dépôt graisseux augmente chez les patients obèses et aide les tumeurs à survivre, à proliférer et à disséminer dans l'organisme.

Chez les patients de poids normal, il existe des différences dans le volume de cette graisse qui s'accumule autour de la prostate. Environ 30 % des patients vont présenter une graisse périprostatique abondante (ou TAPP abondants) et lorsque l'on regarde les types de cancer que ces patients présentent, il s'agit de cancers plus agressifs. Il s'agit donc d'études corrélatives qui suggèrent que ces dépôts adipeux abondants (qui sont certainement différents dans les molécules qu'ils libèrent) vont favoriser l'agressivité du cancer de la prostate. La mesure du TAPP pourrait donc représenter un facteur pronostique important chez l'homme. Toutefois, il convient de démontrer cette hypothèse de façon directe. Pour cela, nous souhaitons développer un modèle murin qui reproduise au plus près le cancer de la prostate et son environnement graisseux. Contrairement à l'homme, la souris ne présente pas ou très peu de graisse autour de la prostate. Cette différence anatomique permettra de greffer autour de la prostate des souris du TAPP humain et dans le même temps d'injecter dans la prostate de ces souris des cellules tumorales prostatiques humaines marquées. Nous suivrons ensuite l'évolution de la tumeur (c'est à dire sa taille et sa dissémination). Ainsi, nous pourrons comparer l'impact des tissus graisseux obtenus à partir de patients présentant un TAPP abondant ou non. La nature des différences de sécrétion entre TAPP abondants ou non sera analysée en parallèle par des approches technologiques adaptées. Lorsqu'un ou des signaux différents seront identifiés, des stratégies de traitement afin d'inhiber le dialogue entre tissu graisseux et tumeurs seront utilisées. A terme, ce modèle nous permettra donc de démontrer de façon directe le rôle du TAPP dans l'agressivité du cancer de la prostate et de proposer un modèle adapté afin de développer des stratégies thérapeutiques innovantes.

Ce modèle original sera mis en place avec des personnels compétents et en particulier des chirurgiens hospitaliers qui assureront la greffe du tissu graisseux et l'injection des cellules tumorales dans la prostate. Des conditions optimales d'anesthésie seront utilisées et des médicaments seront donnés en post-opératoire pour assurer un bien-être optimal. De même, pendant les trois premiers jours post-opératoires, les litières seront surveillées quotidiennement et changées si nécessaire, selon l'observation. Les souris seront hébergées en groupe de 4 ou 5 (selon les procédures) afin de participer au bien-être de ces animaux dont les interactions sociales sont primordiales. Enfin, le suivi non invasif du développement tumoral par échographie permettra

de limiter le nombre d'animaux utilisés puisque le volume tumoral sera évalué plusieurs fois sur le même individu au cours du temps. L'ensemble du projet nécessitera 376 souris mâles, en comptant les mises au point des protocoles. Leur utilisation sera répartie sur différentes expérimentations au cours des cinq prochaines années.

10320 La problématique de ce projet est centrée sur l'intégration corticale des informations somesthésiques. Elle se décline en 2 lignes de recherches réalisées chez le rat. La 1ère concerne le codage neuronal qui sous-tend la perception tactile ; elle est abordée par le biais de l'étude, au sein au cortex somesthésique primaire, des substrats neuronaux de 2 illusions tactiles, le funneling et le hopping. Notre 2ème ligne de recherches concerne la plasticité des réseaux corticaux qui traitent les informations cutanées après un accident vasculaire cérébral (AVC), et en particulier la cinétique de recrutement de nouvelles aires cérébrales susceptibles de sous-tendre la récupération fonctionnelle post-lésionnelle. Les AVC ischémiques représentent la première cause de handicap neurologique acquis chez l'adulte. La compréhension des mécanismes de plasticité cérébrale a permis de relier la récupération fonctionnelle à des événements moléculaires, cellulaires et fonctionnels ayant lieu dans le pourtour de la lésion. Mais, la plasticité post-lésionnelle ne se limite pas à cette zone périlésionnelle, elle est distribuée dans les hémisphères cérébraux lésé et intact, et permet notamment la mise en jeu de zones corticales de suppléance. Actuellement, on connaît mal les relations entre la dynamique de recrutement post-lésionnel des réseaux corticaux et la récupération fonctionnelle. De même, on ne sait pas comment la réorganisation corticale qui sous-tend la récupération fonctionnelle peut être influencée par la réhabilitation fonctionnelle. L'objectif de ce volet de recherche est d'étudier, chez le rat adulte, le remodelage des cartes corticales somesthésiques après une atteinte ischémique focale du cortex somesthésique, à la fois dans l'hémisphère sain et celui lésé, que nous corrélons à la restauration des fonctions sensorimotrices affectées par la lésion. Nous étudierons également les effets d'une réhabilitation fonctionnelle sur la plasticité corticale et la récupération sensorimotrice. Les objectifs même de cette étude, axés sur la compréhension des mécanismes de plasticité mis en jeu après une atteinte ischémique et leur corrélation avec la récupération fonctionnelle nécessitent le recours à des animaux. Nous estimons à 539 le nombre de rats nécessaires pour répondre sur 5 ans aux objectifs expérimentaux de notre étude qui se décline en 4 procédures expérimentales différentes. Afin de répondre de manière optimale à la règle des 3R, le nombre de rats par groupe expérimental sera limité à son strict minimum compte tenu des contraintes de chaque technique expérimentale, avec des analyses statistiques adaptées. Nous limiterons notre étude de la réorganisation corticale après lésion à des délais post-lésionnels cruciaux, que nous avons établis au regard de la littérature dans le domaine. Une médication adaptée (anesthésiques, analgésiques, anti-inflammatoires, antibiotiques) sera mise en œuvre pour éviter toute douleur ou souffrance des animaux. En ce qui concerne les conditions d'hébergement, et selon les nouvelles directives européennes, sera rajoutée dans les cages de la litière foisonnante à base de frisure de papier qui sera renouvelée lors de chaque change.

10321 Notre laboratoire développe depuis de nombreuses années des modèles murins transgéniques permettant l'étude d'un groupe de pathologies, les maladies de dépôt d'immunoglobulines monoclonales, qui viennent gravement compliquer plusieurs maladies hématologiques tel que le myélome multiple. Le pronostic vital des patients est souvent très péjoratif du fait de ces complications. Ces maladies se caractérisent par le dépôt de tout ou partie d'un anticorps monoclonal qui est produit en excès lors d'une prolifération plasmocytaire monoclonale. Les dépôts peuvent se localiser dans différents organes, notamment le rein, et conduire à leur défaillance. Nous souhaitons développer un modèle de rat transgénique d'amylose AL qui surexprime une chaîne légère d'immunoglobuline pathogène isolé d'un patient. Nous souhaitons réaliser ce travail chez le rat car malgré les efforts de nombreuses équipes, dont la nôtre, aucun bon modèle d'amylose AL n'a pu être développé chez la souris, ce qui semble suggérer une « résistance » de cette espèce à cette pathologie. Le but de ce modèle est d'étudier les mécanismes physiopathologiques de développement de cette maladie, d'étudier l'évolution de la fonction des

organes touchés et de développer et/ou de tester des thérapies innovantes lors d'essais précliniques en vue de leur transposition chez les patients.

Une fois les rats générés, nous souhaitons dans un premier temps évaluer le niveau d'expression du gène que nous aurons inséré sur des prélèvements sanguins, puis étudier la fonction des organes potentiellement ciblés par les dépôts de l'immunoglobulines pathogènes par divers dosages biochimiques sur des prélèvements sanguins et urinaires. Une fois ces procédures réalisées, les organes de ces rats seront prélevés sur les animaux euthanasiés afin de réaliser une analyse des lésions histologiques sur différents tissus, notamment le rein. Quelques animaux seront également euthanasiés pour récupérer différentiellement les glomérules afin d'en étudier le transcriptome.

Enfin, si le modèle est relevant pour la pathologie ciblée, la finalité de ce modèle - outre le fait d'élucider les mécanismes physiopathologiques conduisant aux lésions observés - est de tester diverses approches thérapeutiques sur ce modèle, dont une molécule qui est en cours de développement dans notre laboratoire. La présence d'un modèle animal d'amylose AL nous permettrait de valider ou non le bénéfice de la molécule et de potentiellement la proposer à terme aux patients.

L'ensemble de ce projet va nécessiter au maximum l'utilisation de 252 rats. Ce projet répond aux exigences des 3R :

- Remplacement : les modèles cellulaires ne permettent pas de reproduire la complexité de la pathophysiologie des maladies de dépôts qui peut varier par le nombre et la localisation des atteintes d'organes, et ne permettent pas non plus de reproduire l'incidence d'une défaillance d'organe sur un autre organe ou l'organisme dans son entier. D'autre part, les approches thérapeutiques que nous souhaitons tester ont principalement pour objectif de cibler les dépôts d'immunoglobulines et de vérifier les réponses organes. Des modèles murins pour certaines maladies de dépôts ont déjà été développés par le passé et ont permis d'atteindre les objectifs précédemment évoqués.

- Réduction : Nous avons déjà développé des modèles murins pour certaines de ces pathologies, le rat étant une espèce relativement proche, nous avons suffisamment de recul et d'expérience pour limiter les besoins en animaux et de nombreuses expériences déjà au point chez la souris sont transposables au rat. Nos procédures sont peu invasives, ce qui nous permet de réaliser un maximum d'expériences sur un minimum d'animaux.

- Raffinement : Les animaux sont élevés dans des conditions d'hébergement qui respectent leur bien-être (contrôle de la température et de l'hygrométrie de l'environnement, densité d'animaux, présence d'enrichissement, change régulier des litières, eau et nourriture à volonté, surveillance quotidienne des animaux). Toutes les procédures sont réalisées de façon à limiter le stress et la souffrance des animaux (ponction sanguine sous anesthésie, acclimatation progressive des animaux aux cages métaboliques).

10322 L'interaction des plaquettes sanguines avec les composants thrombogènes de la paroi vasculaire joue un rôle primordial d'une part en physiologie, dans le maintien de l'intégrité vasculaire et dans l'hémostase, et d'autre part en pathologie, dans la formation des thromboses et dans l'athérosclérose. Les maladies cardiovasculaires (MCV), majoritairement constituées par les accidents vasculaires cérébraux et les infarctus du myocarde, sont la première cause de mortalité dans le monde. À elles seules, les MCV ont été responsables d'environ 17,5 millions de décès en 2012 selon l'Organisation Mondiale de la Santé, soit 31% de l'ensemble des décès, et pourraient atteindre 23,3 millions en 2030. L'identification et la caractérisation précise des molécules impliquées dans les processus thrombotiques constituent une étape importante pour identifier de nouvelles cibles pharmacologiques et développer de nouveaux outils thérapeutiques plus efficaces. Ce projet de recherche a pour objectif d'étudier le potentiel antiagrégant plaquettaire et anti-thrombotique d'un nouvel agent médicamenteux inhibant l'interaction entre une protéine identifiée comme étant impliquée dans les processus thrombotiques et athérosclérotiques et son récepteur situé à la membrane des cellules.

Dans une première procédure, le potentiel antiagrégant de ce nouveau médicament sera évalué sur des échantillons sanguins prélevés en une seule fois chez la souris anesthésiée.

Dans une deuxième procédure, le potentiel anti-thrombotique de cette molécule sera évalué par vidéo-microscopie intra-vitale dans un modèle murin de thrombose induite par voie chimique au niveau de l'artère carotide de souris préalablement anesthésiées.

Ces modèles expérimentaux sont déjà particulièrement reconnus dans la littérature scientifique puisqu'ils ont permis de caractériser les acteurs moléculaires impliqués dans la mise en place des pathologies cardiovasculaires.

Une troisième procédure consistera à maintenir et amplifier la lignée murine déficiente pour le gène codant la protéine ciblée.

Dans la première procédure (ex vivo), quatre conditions expérimentales seront testées :

- Traitement des plaquettes lavées par la molécule d'intérêt.
- Traitement des plaquettes lavées par une molécule contrôle, comparable d'un point de vue chimique mais inactive.
- Traitement des plaquettes lavées avec le véhicule du médicament seul.
- Traitement des plaquettes lavées avec Ténecteplase (un médicament anti-thrombotique de référence, servant ici de contrôle positif de l'expérimentation).

Dans un premier temps, un nombre limité de 4 souris par condition expérimentale sera considéré pour une étude préliminaire qui permettra de juger de la nécessité de poursuivre l'expérimentation. Cette étude servira également à déterminer le nombre d'animaux nécessaire pour obtenir un résultat statistiquement significatif avec un nombre maximal considéré de 10 souris par condition expérimentale.

En cas de résultat démontrant un effet anti-agrégant significatif du candidat médicament, il conviendra de s'assurer de la spécificité de cet agent innovant vis-à-vis de sa cible moléculaire. Pour cela, il sera nécessaire de reproduire cette même procédure avec des prélèvements sanguins de souris possédant le même fond génétique mais déficientes pour le gène codant la protéine ciblée. Par souci de reproductibilité, un nombre maximal de 10 souris par condition expérimentale sera également considéré.

Cette première procédure est donc susceptible d'inclure un nombre maximal de 96 souris :

- Étude préliminaire : 4 souris x 4 conditions soit 16 souris.
- Poursuite de l'étude : 10 souris x 4 conditions x 2 génotypes soit 80 souris.

Pour la deuxième procédure (in vivo), les quatre mêmes conditions expérimentales seront considérées.

Dans cette seconde procédure, 4 souris seront à nouveau considérées par condition expérimentale dans le cadre d'une étude préliminaire qui permettra de juger de la nécessité de poursuivre l'expérimentation. Cette étude pilote permettra de déterminer le nombre d'animaux nécessaire à l'obtention d'un résultat statistiquement significatif avec un nombre maximal de 15 souris par condition :

- Injection rétro-orbitaire du candidat médicament (10 mg/kg) dilué dans 100 µL de sérum physiologique.
- Injection rétro-orbitaire du contrôle inactif (10 mg/kg) dilué dans 100 µL de sérum physiologique.
- Injection rétro-orbitaire de sérum physiologique (NaCl 0,9 %, 100 µL).
- Injection rétro-orbitaire du médicament de référence Ténecteplase (100 U/kg) dilué dans 100 µL de sérum physiologique.

En cas de résultat démontrant un effet anti-thrombotique significatif du candidat médicament, ces 4 conditions expérimentales seront également testées sur des souris déficientes pour l'expression de sa cible moléculaire, toujours dans le but de démontrer sa spécificité d'action, et en considérant pour ce faire un nombre maximal de 15 souris par condition expérimentale.

Cette deuxième procédure est donc susceptible d'inclure un nombre maximal de 136 souris ([4 souris x 4 conditions] + [15 souris x 4 conditions x 2 génotypes]).

Au total, cette étude comprenant les 2 procédures est susceptible d'inclure un nombre maximal de 232 souris (96 + 136).

Par souci de reproductibilité et afin de s'affranchir d'une variable biologique supplémentaire, uniquement des souris mâles seront considérées (pas d'influence du cycle menstruel).

Actuellement aucun modèle de substitution n'existe pour mesurer l'effet d'une substance sur le phénomène complexe, multifactoriel et multicellulaire, qu'est la thrombose artérielle. Nous n'avons

donc pas d'autres choix que d'utiliser un modèle animal pour apporter la preuve de concept de l'efficacité thérapeutique de cette molécule.

Une anesthésie des animaux sera maintenue durant toute la durée de l'expérience (sans réveil) afin de prévenir tout type de souffrance. Au cours de l'anesthésie, les signes vitaux seront surveillés avec une attention particulière portée à la respiration et au rythme cardiaque avec un maintien de la température corporelle grâce à une plaque thermorégulée et une lampe chauffante. Dans un souci de limiter le stress des animaux, les cages seront enrichies de divers équipements d'activité (tubes de jeu en carton, niche, papier, etc.).

À terme, la réalisation de ce projet scientifique pourrait mener au développement d'un nouveau traitement des pathologies thrombotiques.

10323 Les lymphocytes B (LB) sont capables de reconnaître une grande diversité d'antigènes (Ag) via leurs récepteurs pour l'Ag, BCR (récepteur des cellules B). Ce répertoire de reconnaissance est généré à partir des gènes situés sur les loci IgL et IgH, ce dernier étant localisé sur le chromosome 14 et codant les chaînes lourdes (IgH) des immunoglobulines (Ig) ou BCR.

Lors d'une réponse primaire, l'activation T dépendante des LB par l'Ag dans les centres germinatifs des organes lymphoïdes secondaires provoque une prolifération cellulaire soutenue suivie de la maturation terminale des LB en plasmocytes sécréteurs d'Ig ou en LB mémoires. Cette maturation peut se caractériser en l'occurrence de deux événements majeurs : la commutation de classe ou commutation isotypique des Ig (class switch recombination, CSR) et l'hypermutation somatique (somatic hypermutation, SHM). La CSR est une recombinaison intra-chromosomique qui a lieu sur le locus IgH entre deux régions switch (S) situées en amont de chaque segment constant (C) codant la région constante des Ig. Elle permet la synthèse de différents isotypes d'Ig caractérisés chacun par des fonctions effectrices distinctes sans affecter la spécificité antigénique des Ig. La SHM crée des mutations ciblées sur les segments géniques variables (V) de l'IgH et de l'IgL qui modifient l'affinité de l'anticorps produit.

La régulation stricte de ces modifications de l'ADN est nécessaire pour assurer le fonctionnement correct du système immunitaire. Toute dérégulation peut conduire au développement des processus cancérogènes ou des immunodéficiences. Plusieurs éléments cis-régulateurs de la transcription et de l'accessibilité des gènes existent pour le locus IgH. Il s'agit de promoteurs, de l'activateur intronique E_{μ} et de la région de régulation 3'RR (3' regulatory region) située en 3' du locus IgH. Ces remaniements du locus nécessitent la formation de boucles d'ADN à longue distance qui rapproche le E_{μ} , la 3'RR et les régions switch et la transcription de l'ADN en ARN par la polymérase d'ARN pol II (Pol II)

Médiator est un complexe multiprotéique nécessaire pour la transcription des gènes par Pol II. Il agit comme une interface entre Pol II et les facteurs de transcription. Mediator intervient dans l'initiation de la transcription de l'ARN par Pol II et sa régulation. Il est recruté aux régions E_{μ} et 3'RR dans les lymphocytes B qui subissent la CSR. Des résultats obtenus précédemment montrent que l'inactivation de Médiator diminue la CSR in vitro et in vivo dans un modèle murin « knock out » pour Med 1 (Med 1 KO).

Ce projet s'inscrit dans la continuité de l'exploration du rôle du Médiator dans la recombinaison du locus IgH dans le modèle murin Med 1 KO en examinant l'effet d'un déficit de la sous unité Med 1 du complexe Médiator sur différents paramètres de recombinaison génétique pouvant soulever des questionnements relatifs à des immunodéficiences.

Ce projet utilise au total 80 souris.

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

Remplacer : Des études in vitro au préalable sur des cellules CH12 ont permis de montrer un effet sur le switch vers IgA. Néanmoins il n'y a pas d'autres lignées cellulaires disponibles qui recombinent pour produire d'autres isotypes ce qui nécessitent le recours à des souris. Les modèles in vitro ne permettent pas de modéliser la complexité de la réponse immunitaire d'un organisme entier. La souris est l'espèce modèle la plus adaptée du fait qu'il existe une très forte homologie de structure et fonction entre les loci IgH humain et murin faisant de la souris un modèle expérimental incontournable pour l'étude des dysfonctionnements immunitaires. L'étude des différentes sous

populations de cellules B, des études de la LSR, l'hypermutation, le trans switch ou la formation de centre germinatif ne peuvent pas non plus être faites sur des lignées cellulaires.

Réduire : Les expériences sont organisées dans un ordre précis, avec des témoins choisis de sorte à limiter la répétition d'expériences. Les manipulations sont réalisées de façon indifférente sur des mâles et des femelles, permettant ainsi une réduction du nombre d'animaux générés dans l'élevage. A la fin de l'expérimentation, les souris sont euthanasiées et tous les organes d'intérêt pour toutes les manipulations sont prélevés pour la suite de l'étude pour réduire la répétition des manipulations. Raffiner : les animaux sont élevés dans des conditions d'hébergement (température et hygrométrie de l'environnement, densité d'animaux, présence systématique d'enrichissement, change régulier de la litière, nourriture et eau ad libitum, surveillance quotidienne de l'état général des animaux) qui respectent leur bien-être. De plus, l'ensemble des procédures sera réalisé de manière à limiter le stress et la souffrance des animaux (prélèvement de sang sous anesthésie)

10324 En dépit d'avancées considérables dans le traitement du cancer colorectal, les effets secondaires des thérapies actuellement utilisées restent très fréquents du fait du manque de préservation des tissus sains bordant la tumeur. De plus, la résistance aux thérapies anti-tumorales mais également l'importance des cas de récurrence restent des problèmes majeurs rencontrés. Pour pallier ces problèmes, la recherche médicale tend à développer des méthodes de thérapie focale du cancer colorectal et également, de comprendre et contrecarrer les phénomènes de résistance aux traitements qui peuvent se mettre en place. Dans le cadre de cette thérapie focale du cancer colorectal, la photothérapie dynamique (PDT) repose sur l'utilisation de molécules photosensibles appelées photosensibilisateurs (PS). Après avoir ciblé spécifiquement les cellules cancéreuses, ces PS sont activés par la lumière et vont induire la production d'espèces hautement toxiques pour les cellules cancéreuses à l'origine de leur destruction. Ces effets oxydatifs sont donc confinés aux zones ayant à la fois accumulé le PS et ayant été soumises à l'irradiation. La ligne directrice du laboratoire avec qui nous travaillons est de synthétiser de nouveaux PS capables de cibler spécifiquement les cellules cancéreuses afin d'optimiser l'effet thérapeutique. Dans cette étude, les PS sont vectorisés à l'aide de nanoparticules de silice sur lesquelles peuvent être greffés les PS. A partir de résultats in vitro déjà obtenus au laboratoire, ces PS seront évalués in vivo à partir de xénogreffes de cellules cancéreuses colorectales humaines à des souris immunodéprimées (30 souris réparties en 6 groupes correspondant à chaque condition de traitement). La vectorisation à l'aide des nanoparticules de silice permet, d'après la littérature, de cibler les zones de tumeur in vivo. La finalité du projet étant de mettre en lumière de nouvelles molécules thérapeutiques capables de stopper la prolifération tumorale en réduisant au maximum les effets secondaires. Ce projet utilise au total 30 souris.

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

Remplacer : les modèles in vitro ne permettent pas de modéliser la complexité de la réponse d'un organisme entier face à l'administration de thérapeutiques anticancéreuses et l'impact de la voie d'administration. Ils sont aussi insuffisants pour envisager des essais cliniques chez l'Homme. Les modèles murins de greffe de cellules tumorales humaines sont bien décrits et permettent de mimer le phénomène observé chez l'Homme. Ils permettent également d'apprécier de manière beaucoup plus globale, notamment dans un contexte de régulations hormonales, l'effet des thérapeutiques.

Réduire : le modèle de greffe de cellules tumorales humaines est maîtrisé par l'équipe et le porteur de ce projet, ce qui permet de limiter les étapes de mises au point. De plus, les expériences sont organisées dans un ordre précis, avec des témoins choisis de sorte à limiter la répétition d'expériences. La souris est l'espèce modèle la plus adaptée pour ces études précliniques. Le nombre d'animaux a été évalué afin de garantir une puissance statistique suffisante à l'étude tout en utilisant le moins de souris possible.

Raffiner : les animaux sont élevés dans des conditions d'hébergement (température et hygrométrie de l'environnement, densité d'animaux, présence systématique d'enrichissement, change régulier de la litière, nourriture et eau ad libitum, surveillance quotidienne de l'état général des animaux) qui respectent leur bien-être. De plus, l'ensemble des procédures sera réalisé de manière à limiter le stress et la souffrance des animaux (greffe et photothérapie sous anesthésie, tapis chauffant pendant la greffe et la photothérapie, analgésique et anti-inflammatoire si besoin).

- 10325** Ce projet de recherche translationnelle dont la durée maximale sera de trois ans vise à :
- valider le plus précocement possible l'apparition de microcalcifications de plaques d'athérosclérose chez un modèle de souris soumises à un régime gras par micro Tomographie par Emission de Positons (TEP) au 18F-NaF (un traceur du métabolisme osseux) puis
 - étudier l'effet d'un inhibiteur de la minéralisation physiopathologique sur le développement de microcalcifications de ces plaques d'athérosclérose.

Les complications cardiovasculaires ischémiques, résultant de la rupture d'une plaque d'athérosclérose, constituent la première cause de mortalité des français de plus de 65 ans. Bien que la calcification des plaques soit un marqueur clinique de leur avancement directement corrélé avec la survenue d'événements cliniques, les mécanismes de la formation de la calcification ainsi que son rôle dans la rupture des plaques sont encore assez controversés. Aujourd'hui, les plaques à risque ne sont définies qu'à posteriori sur la base de l'histopathologie.

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

Règle des 3R et nombre d'animaux :

La culture cellulaire est très utile pour déterminer les mécanismes moléculaires impliqués dans la formation des microcalcifications, ou dans l'effet des microcalcifications sur les cellules inflammatoires. Par contre, elle est inadaptée pour reproduire les mécanismes de l'athérosclérose in-vivo. En effet, la plaque d'athérosclérose est un tissu très hétérogène qui ne peut pas être reproduite en culture. C'est pourquoi le recours à l'animal est indispensable.

Le projet sera scindé en deux étapes, la première consistera à déterminer le plus précisément possible à quel moment se forment les microcalcifications dans le modèle ApoE^{-/-} soumis à un régime gras.

Le développement des microcalcifications sera étudié longitudinalement par 18F-NaF- μ TEP à des âges de 18, 24 et 30 semaines sur huit souris. Cette méthode d'imagerie a été utilisée avec succès sur ce modèle mais à des temps plus tardifs. Il est nécessaire de valider que la détection fonctionne dans le cas de points plus précoces.

En fin d'expérimentation ils sont placés dans une cage de réveil, sous une lampe chauffante, derrière une protection plombée le temps de la décroissance radioactive.

La seconde tâche ne sera réalisée que si des microcalcifications ont pu être mises en évidence à l'un des trois points de mesure. Elle consistera à prévenir le développement des microcalcifications par l'inhibiteur de la minéralisation physiopathologique, administré per os chez 16 souris 3 semaines avant les premiers signes de microcalcification détectés lors de la première étape. Un lot de 16 souris non traitées servira de groupe contrôle. Le suivi longitudinal par micro TEP au 18F-NaF sera le même que celui utilisé pour la première étape.

Un nombre total de 40 souris sera donc nécessaire si la TEP permet de détecter les microcalcifications. Il sera de 8 souris si la méthode n'a pas été concluante.

Le développement de la maladie ne compromet pas la survie des animaux, qui dans cette étude ne seront pas conservés à des stades très avancés de la maladie (euthanasie au plus tard semaine 45). L'utilisation de l'inhibiteur de la minéralisation physiopathologique n'a pas entraîné de douleurs manifestes chez les souris traitées dans les études précédentes. Nous n'attendons donc pas d'effets néfastes sur nos animaux. Afin de réduire le stress, les souris sont hébergées en groupes sociaux par groupes de 5, avec des formes d'enrichissement (nids, igloos) à disposition.

Les animaux sont sous anesthésie générale (air 0,8l/min, isoflurane 3,5% en induction puis air 0,6l/min, isoflurane 2,5% pour le maintien) pour la pose du cathéter et la réalisation de l'imagerie. Leur rythme respiratoire est monitoré et leur température est maintenue grâce à un tapis chauffant pendant toute la durée de l'anesthésie.

- 10326** Les lymphocytes B (LB) participent à la défense de l'organisme contre les pathogènes dans la réponse immunitaire humorale du fait de leur capacité à sécréter des immunoglobulines (Ig) ou

anticorps (Ac) capables de lier et neutraliser les antigènes (Ag). Les LB sont activés par un Ag dans les organes lymphoïdes secondaires comme la rate ou les ganglions lymphatiques. La liaison de l'Ag par le récepteur à la surface des LB, le BCR, stimule les LB à une prolifération intense aboutissant à la formation de structures appelées centres germinatifs. Dans le même temps les LB subissent une maturation terminale au cours de laquelle peut avoir lieu la commutation isotypique des Ig (CSR). Le BCR est formé entre autres par une Ig, elle-même constituée par une deux chaînes lourdes d'Ig identiques (IgH) et deux chaînes légères identiques (IgL). Le type d'Ig exprimé par les LB varie avec le développement des LB : les LB expriment une IgM avant leur rencontre avec un Ag et leur stimulation à la CSR peut induire l'expression d'une autre classe d'Ig (IgG, IgA, IgE). La CSR est une recombinaison de l'ADN du locus codant pour l'IgH qui en remaniant les gènes de l'IgH permet l'expression des différentes classes d'Ig. Chaque classe d'Ig est caractérisée par une fonction, une distribution tissulaire et une durée de vie spécifiques et adaptées pour une réponse optimale contre l'Ag. En 2012, Notre laboratoire a mis en évidence pour la première fois une recombinaison génétique du locus codant pour l'IgH qui entraîne la délétion des gènes déterminant la classe de l'IgH, empêche l'expression de l'IgH et abolit la formation du BCR à la surface des LB. Le BCR est indispensable à la survie des LB et cette recombinaison génétique a été appelée recombinaison suicide du locus IgH (LSR).

LSR et CSR sont des recombinaisons de l'IgH et procèdent par un schéma d'étapes semblable : transcription des régions génétiques ciblées par les recombinaisons, introduction de lésions de l'ADN qui vont former des cassures et réparation de ces cassures. Néanmoins, nous avons observé que la réparation de l'ADN au cours de la LSR fait appel à des voies de réparation des cassures de l'ADN différentes de celles mises en jeu lors de la CSR.

Le projet vise à étudier l'implication des voies de réparation de l'ADN au cours de la LSR et de déterminer si les systèmes de réparation influencent la fréquence de la LSR. Ainsi nous établirons s'il existe une balance entre LSR et CSR.

Pour cela, nous allons monitorer par analyse moléculaire la fréquence de la LSR et de la CSR dans les LB de souris portant un défaut de la voie de réparation de l'ADN impliquée dans la CSR, souris déficientes pour XRCC4 dans les LB (XRCC4 cKO) et nous étudierons la signature de réparation de la LSR et de la CSR dans ces LB. Nous comparerons les résultats avec ceux obtenus dans les LB de souris contrôles. Ce projet s'inscrit dans l'exploration de la fonction physiologique de la LSR et dans l'étude de l'influence des voies de réparation des cassures double brin de l'ADN sur les recombinaisons du locus IgH.

Ce projet utilise au total 140 souris et répond aux exigences des 3R, à savoir :

Remplacer : Le développement des sous populations de LB, l'activation des LB et la réponse immunitaire sont conditionnés par les interactions entre les LB et d'autres cellules dont celles localisées au sein des organes lymphoïdes (Moelle osseuse, rate, ganglions lymphatiques) ainsi leur étude est impossible dans une lignée cellulaire in vitro. De plus, Il existe une très forte homologie de structure et fonction entre les gènes d'immunoglobuline humain et murins faisant de la souris un modèle expérimental incontournable pour l'étude du système immunitaire et des événements de recombinaison du locus IgH.

Réduire : 10 couples de souris seront accouplés pour générer 140 souris qui seront étudiées 6 souris XRCC4 cKO et 6 souris contrôles seront utilisées pour chaque manipulation pour diminuer l'écart type entre les valeurs et pouvoir effectuer les analyses statistiques.

Les manipulations sont réalisées 5 fois de manière indépendante. Ceci permet de déterminer la variabilité et reproductibilité de nos résultats.

Par ailleurs, une deuxième série de manipulation identique à la première est réalisée sur des souris immunisées.

On prévoit l'utilisation de 140 souris (130 souris auquel sont ajoutées 10 souris en cas d'imprévu).

Raffiner : les animaux sont élevés dans des conditions d'hébergement (température et hygrométrie de l'environnement, densité d'animaux, présence systématique d'enrichissement, change régulier de la litière, nourriture et eau ad libitum, surveillance quotidienne de l'état général des animaux) qui respectent leur bien-être. De plus, l'ensemble des procédures sera réalisé de manière à limiter le stress et la souffrance des animaux (Les euthanasies seront réalisées au CO2 à l'aide d'un appareil Quietec).

10327 La ventilation mécanique (VM) est nécessaire chez 30 à 50% des patients admis en réanimation. Malgré le bénéfice évident de cette prise en charge respiratoire, la VM induit, dès 18-24 h de ventilation, une altération de la fonction des muscles respiratoires, essentiellement le diaphragme. On parle de dysfonction du diaphragme induite par la ventilation mécanique (VIDD). La VIDD oblige le médecin à maintenir le patient en ventilation mécanique et contribue à l'échec de sevrage du ventilateur. Il n'existe à ce jour aucune piste thérapeutique efficace pour diminuer la sévérité de la VIDD. Notre équipe a identifié au cours de la VIDD une dysfonction d'un canal calcique intracellulaire (les récepteurs de la ryanodine de type 1 ou RyR1). La dysfonction de ce canal a été observée aussi bien chez la souris et le porc que chez le patient de réanimation. Chez la souris, la prévention pharmacologique de cette dysfonction de RyR1 prévient la VIDD.

Par ailleurs, nous avons montré que des dérivés oxydés de l'acide gras omega-3 (l'acide docosahexaénoïque ou DHA) pouvaient avoir une action bénéfique sur le fonctionnement des récepteurs de la ryanodine cardiaque. Dans ce contexte, les formes oxydées de la DHA préviennent également la dysfonction des RyR1 et la perte de force diaphragmatique au cours de la VIDD chez la souris.

L'objectif de l'étude est de valider l'effet bénéfique d'un dérivé oxydé de la DHA, l'hexanor, sur un modèle porcin de VIDD afin d'envisager la possibilité d'une nouvelle thérapeutique chez l'homme. Le choix de l'animal est essentiel dans ce protocole car le porc, par sa taille et les protocoles d'anesthésie et de ventilation, est le modèle expérimental le plus proche d'un patient ventilé en soins intensifs. Les résultats ainsi obtenus dans ce protocole seront immédiatement transposables à l'homme.

La règle des 3R sera respectée :

(Remplacer) Il s'agit d'une étude translationnelle qui a pour objectif de vérifier la pertinence de l'utilisation d'un médicament dans un contexte précis. Il n'existe pas de méthode alternative permettant d'atteindre cet objectif dans des conditions le plus proches possibles des cas cliniques.

(Réduire) Le nombre d'animaux utilisés sera réduit via une approche rationnelle et organisée sur le plan des protocoles : études histologiques et analyses biochimiques réalisés sur les mêmes échantillons dès que la méthode de conservation le permet et sur les animaux qui auront été monitorés préalablement in vivo (ces explorations in vivo étant sans conséquences directes délétères sur les critères secondaires d'évaluation). C'est pourquoi seulement 3 animaux seront utilisés pour l'étude préliminaire de pharmacocinétique, et 2 groupes de 6 animaux pour la phase de test qui est un nombre minimum pour obtenir une différence significative.

(Raffiner) : La souffrance et l'angoisse de l'animal seront prévenues par la réalisation d'une anesthésie générale pendant toute la durée du protocole. Lors de la réalisation d'un acte douloureux, un morphinique sera administré à l'animal. Aucun animal ne sera réveillé, l'euthanasie étant réalisée sous anesthésie générale. L'ensemble de la procédure expérimentale sera réalisé par du personnel ayant suivi et validé une formation spéciale à l'expérimentation animale permettant la conception et la réalisation de procédures expérimentales. Ils seront assistés par des experts en anesthésie-réanimation afin de palier toute complication pouvant intervenir pendant les procédures expérimentales.

10328 Les maladies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité dans les pays développés. De nombreuses molécules actuellement sur le marché pour traiter la thrombose sont issues d'organisme tel que les serpents, les tiques ou encore les sangsues. Le but de ce projet est de tester dans différents modèles précliniques l'effet d'une molécule issue du tique *Ixodes ricinus*. Des expérimentations effectuées in vitro ont permis de mettre en évidence un potentiel anti-thrombotique. Nous souhaitons maintenant tester l'effet de cette molécule d'une part dans un modèle permettant d'activer la cascade de coagulation de manière dépendante de la voie extrinsèque (activation via le facteur XII) par création de thrombose veineuse profonde (DVT) et d'autre part par un modèle dépendant de la voie intrinsèque (activation via le facteur tissulaire) par un modèle de blessure au rayon laser en microscopie intravitale en temps réel. Après l'évaluation de son effet sur la thrombose nous étudierons l'effet de cette molécule sur la thrombose associée au cancer. Nous utiliserons comme modèle préclinique l'implantation ectopique de cellules cancéreuses pancréatiques. Ce cancer est reconnu dans la littérature pour être fortement pro-

thrombotique. L'étude des paramètres de l'hémostase tels que la cinétique de l'accumulation de plaquettes, la cinétique de la génération de fibrine, la quantification des neutrophiles au site de blessure, leur activation en temps réel ne peuvent pas être réalisés in vitro. Ce projet nécessite une totalité de 148 souris. Dans le but de respecter la règle des 3R, les souris sont hébergées par groupe de 5 avec comme enrichissement du coton pour nidification ou des dômes. La totalité des expérimentations sera effectuée par du personnel compétant sous anesthésie générale volatile ou injectable. Afin de limiter la douleur que pourrait engendrer les implantations de cellules tumorales en sous cutanée sur le flanc des animaux, nous les évaluerons tous les jours grâce à une grille de score (modifiée de Morton et Giffiths) jusqu'à la fin du protocole. Les expérimentations de microscopie intravitale et de temps de saignement sont ici des expérimentations sans réveil et sont réalisées sous anesthésie générale injectable. Les animaux sont maintenus sous anesthésie profonde durant toute l'expérimentation puis euthanasiés par un excès d'anesthésique. Le nombre de souris a été calculé au plus juste pour obtenir une différence significative suivant les différentes techniques utilisées. Dans un souci d'utilisation d'un nombre minimal d'animaux, le nombre total d'animaux annoncé (148) pourra ne pas être atteint. En effet si une différence significative est obtenue entre les groupes expérimentaux la totalité des lots annoncés ne sera pas utilisé. Dans la mesure du possible plusieurs tests seront pratiqués à partir des mêmes animaux comme le temps de saignement et la microscopie intravitale.

- 10329** La consommation de viande rouge va provoquer, via sa richesse en fer héminique, la formation de composés toxiques appelés aldéhydes, ce qui est proposé pour expliquer l'effet de la consommation de viandes rouges sur le risque cancer du côlon. Des travaux précédents ont permis de montrer que la consommation de fer héminique modifiait la composition du microbiote intestinale et augmentait la perméabilité intestinale chez le rat et qu'un régime riche en antioxydant pouvait limiter les effets délétères du fer héminique. En collaboration avec des équipes européennes, ce projet collaboratif propose de définir le rôle du microbiote dans l'effet promoteur des viandes rouges sur le cancer du côlon, et dans la protection de cet effet par les antioxydants. La partie du projet décrite dans cette saisine vise donc à évaluer l'effet d'un régime riche en viande, d'un régime riche en viande et antioxydant (vitamine E) et d'un régime sans viande (poisson, épinard dit régime PESCO) sur la promotion de la carcinogenèse colorectale au stade précoce, sur la perméabilité intestinale et sur le microbiote. Nous proposons une expérimentation nutritionnelle de 100 jours chez 48 rats mâles pour évaluer l'effet sur la carcinogenèse colorectale (procédure 1) avec un dénombrement post-mortem des lésions précoces dites prénéoplasiques et une expérimentation nutritionnelle de 15 jours chez 32 rats mâles F344 conventionnels pour évaluer l'effet sur la perméabilité intestinale (procédure 2). Pour ces deux procédures, 4 groupes seront constitués afin de suivre les biomarqueurs fécaux et urinaires de l'effet promoteur du fer héminique (formation des aldéhydes et toxicité des contenus coliques), les modulations de l'inflammation de la muqueuse colique, la composition du microbiote et respectivement le dénombrement des lésions précancéreuses coliques dans la procédure 1 (12 rats par groupe) et la perméabilité intestinale dans la procédure 2 (8 rats par groupe). Cette expérimentation sans prélèvement sur les animaux hors fèces et urines sera conduite dans le cadre de la règle des trois R : le nombre des animaux est réduit au maximum pour toutefois maintenir une puissance statistique suffisante, les conditions expérimentales (suivi de la carcinogenèse au stade prénéoplasique ne provoquant pas de douleur, point limites et critères d'interruption et injection sous-cutanée avec un solution préalablement tamponnée dans la procédure 1 et gavage unique avec sonde à bout arrondi en procédure 2) éviteront la douleur animale. Les rats seront hébergés dans des locaux d'animalerie conventionnels, leur assurant les meilleures conditions de vie et de bien-être. L'utilisation d'un modèle animal est indispensable car nous travaillons au niveau du côlon où le microbiote joue un rôle très important.
- 10330** Une des fonctions majeures de l'intestin est son rôle de barrière qui vise à limiter l'entrée dans l'organisme de composés potentiellement délétères. Cette fonction de barrière est altérée dans de nombreuses pathologies comme les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, le syndrome de l'intestin irritable ou le cancer colorectal. La mise en place de la barrière intestinale et ses régulations sont des mécanismes complexes. Une souris transgénique présente, grâce à une

enzyme appelée MLCK, une altération congénitale de la barrière intestinale. Ceci en fait un modèle d'étude très intéressant pour comprendre les conséquences d'une fonctionnalité altérée de la barrière intestinale et d'une ingestion d'additifs alimentaires, utilisés à des concentrations auxquelles est exposée la population, sur la fonction barrière de l'intestin (mucus, microbiote et épithélium) et sur le comportement (anxiété) des animaux. Seule une approche intégrée utilisant des animaux permet d'étudier les interactions entre les axes intestin-foie et intestin-cerveau.

Ce projet nécessite 120 souris transgéniques issues de l'élevage de l'unité, et leurs 120 contrôles "sauvages", nombre minimal et nécessaire pour obtenir une bonne puissance statistique pour une interprétation robuste des résultats obtenus. Les animaux sont élevés dans des conditions optimales d'hébergement (contrôle des températures, enrichissement de l'habitat), et leur bien-être est assuré par une surveillance quotidienne et une rapide prise en charge d'un éventuel inconfort.

Ce projet vise à déterminer si une barrière moins efficace peut induire une réaction exacerbée aux contaminants alimentaires et aux produits néoformés exogènes et endogènes au niveau de l'intestin et du foie.

10331 Chez l'Homme, les cancers cutanés de l'épiderme sont en augmentation et constituent donc un réel problème de santé publique. L'objectif général du projet est de comprendre l'influence du microenvironnement tumoral sur les fonctions des cellules du système immunitaire au niveau de la peau afin d'identifier et de valider des approches d'immunothérapies anti-cancéreuses. En effet, les tumeurs épithéliales se développent suite à une défaillance de l'immunité anti-tumorale et il est donc crucial de pouvoir reprogrammer cette immunité. Les objectifs spécifiques de ce projet sont de disséquer les fonctions des cellules immunitaires présentes dans la tumeur au cours de son développement et de valider des cibles potentielles d'intervention immunothérapeutique.

D'un point de vue expérimental, nous souhaitons utiliser deux modèles murins de cancers épithéliaux : le premier modèle consiste à implanter la lignée tumorale mSCC-38 isolée d'une tumeur cutanée induite par traitement chimique au niveau de la peau de souris immunocompétentes de même fond génétique (modèle orthotopique et syngénique). Le deuxième modèle consiste à implanter localement la lignée épithéliale tumorale nommée PDVC57 induite par traitement chimique in vitro de kératinocytes (modèle orthotopique et syngénique). Ce sont deux modèles murins complémentaires chez la souris immunocompétente dont les tumeurs ont un infiltrat immunitaire qui présente des similitudes avec le cancer épithélial de la peau chez l'Homme. Les modèles d'implantation de cellules mSCC-38 et PDVC57 ont un développement lent adapté pour une analyse séquentielle du phénotype et de la fonction de l'infiltrat immunitaire d'une part et pour la validation de cibles thérapeutiques d'autre part (~40 jours pour atteindre le point limite). Les deux modèles se développent sur des fonds génétiques différents, ce qui permet de valider les résultats dans deux modèles et d'avoir accès à de nombreux outils immunitaires compatibles avec l'analyse mécanistique d'une cible thérapeutique.

Au total, nous aurons besoin de 1380 C57BL/6J et 1380 FVB/N pour répondre à nos questions biologiques sur 5 ans et obtenir des résultats statistiquement valides.

Le nombre d'animaux a été déterminé en tenant compte des 3Rs :

Réduction : nous avons déterminé les effectifs de nos groupes de manière à obtenir une forte validité statistique avec un minimum d'individus et notre projet a été conçu pour optimiser la quantité d'informations analysables.

Remplacement : Il n'y a pas actuellement de méthodes alternatives in vitro permettant de mimer l'environnement épithélial tumoral. De plus, les cellules qui nous intéressent sont faiblement représentées au sein des tumeurs épithéliales (moins de 2% dans une tumeur totale), nous obligeant à utiliser des groupes de souris assez importants pour obtenir suffisamment de cellules expérimentalement. Enfin, nous voulons évaluer l'effet d'anticorps dirigés contre des cibles thérapeutiques potentielles ce qui nécessite des études chez la souris.

Raffinement : Le suivi de l'évolution des lésions, le suivi des animaux sera effectué conformément à une grille d'évaluation permettant de définir un niveau de douleur/souffrance à partir duquel les animaux concernés seront euthanasiés. Les animaux seront pesés une fois par semaine à partir de leur mise en expérimentation et observés 2 fois par semaine afin d'évaluer leur état général selon les critères définis dans la grille d'évaluation.

10332 Comprendre les mécanismes qui sous-tendent la formation et le stockage de la mémoire est un enjeu important pour le domaine des Neurosciences. La neurogenèse dans l'hippocampe et le bulbe olfactif adultes, est aujourd'hui considérée comme un mécanisme clé de plasticité cérébrale impliqué dans les processus de mémoire. Différents modèles expérimentaux (exercice physique, stress, âge, enrichissement environnemental etc...) ont permis de mettre en parallèle le niveau de neurogenèse avec les performances de mémoire, mais seuls les modèles qui agissent directement sur la genèse ou l'activité des nouveaux neurones permettent de corréliser plus directement ces processus. Différents modèles de blocage de la neurogenèse chez le rat non transgénique ont été utilisés ces dernières années dont le blocage pharmacologique (qui présente l'inconvénient de modifier le comportement général de l'animal) ou l'irradiation par rayons X ou gamma (peu sélective en termes de zone à cibler et absence de dosimétrie effective). C'est pourquoi nous travaillons sur la mise au point d'un nouveau modèle d'inhibition de la neurogenèse adulte grâce au système SARRP (small animal radiation research platform). Ce système permet l'irradiation de zones précises sans altérer les zones avoisinantes tout en maîtrisant les doses utilisées. Le modèle ainsi obtenu requiert par contre d'être validé sur un certain nombre d'aspects tels que la diminution effective de la formation de nouveaux neurones et la cinétique d'inflammation post irradiation.

La validation de ces paramètres est indispensable avant de pouvoir utiliser ce modèle prometteur dans les projets de recherche de notre laboratoire.

L'objectif de ce projet de recherche fondamentale d'une durée maximale de 5 ans est de valider que le délai nécessaire à la disparition de l'inflammation induite par l'inhibition de la neurogenèse est de deux mois. Pour cela, nous réaliserons des imageries de Tomographie par Emissions de Positons associées à l'injection d'un traceur métabolique de l'inflammation une semaine après l'irradiation (référence d'inflammation maximale) puis neuf semaines après l'irradiation sélective en SARRP (évaluation de la diminution ou disparition de l'inflammation). Ce délai correspond au moment où les animaux expérimentaux seront dans une phase critique de la tâche de mémoire épisodique que nous utilisons pour tester le rôle de la neurogenèse adulte dans la mémoire épisodique. L'irradiation aura lieu dans le laboratoire partenaire qui est autorisé pour la réalisation de ce modèle.

Cette étude ne peut pas être remplacée par une étude alternative étant donné que le but est de décrire un modèle animal pour lequel il n'existe pas, à ce jour, de description fonctionnelle de l'inflammation.

Un maximum de 18 rats sera inclus dans l'étude. Trois groupes de 2 rats seront étudiés lors de la première étape. En cas de résultat concluant, elle sera répétée deux fois dans le but d'obtenir une statistique suffisante. Si l'imagerie TEP précoce ne permet pas d'observer d'inflammation les images tardives ne seront pas réalisées et les groupes 2 et 3 ne seront pas inclus dans l'étude.

Aucun effet néfaste n'est attendu sur les animaux. L'irradiation sans signe clinique est réalisée sous anesthésie générale, une semaine avant réception au laboratoire. Seuls les animaux dont l'état clinique est jugé satisfaisant nous sont livrés. Ils seront hébergés par cage de 6 en respectant les groupes sociaux et ils auront une phase d'acclimatation de 7 semaines avant la réalisation de l'imagerie. Les rats seront observés quotidiennement et pesés une fois par semaine dans le but de prévenir tout risque de mal être. A la suite de l'imagerie, ils seront euthanasiés pour continuer l'exploration de l'inflammation en imagerie ex- vivo.

10333 L'arthrose est une maladie de l'ensemble de l'articulation détruisant le cartilage et changeant l'os sur lequel il repose. Ces changements de l'os se traduisent aussi par la formation d'ostéophyte qui est une excroissance osseuse autour de l'articulation. D'après certains auteurs il serait responsable de la douleur associée à la maladie.

La matriline-3 est une protéine matricielle du cartilage. La mutation T298M du gène induit une maladie responsable d'une arthrose initialement localisée aux mains et aux disques inter-vertébraux, puis des douleurs articulaires de type arthrosique. Des souris générées par nos partenaires ne développent pas d'anomalies du cartilage articulaire en dehors des conditions de contraintes mécaniques. C'est le cas pour de nombreux composants des tissus articulaires pour lesquels la déstabilisation du ménisque induit l'arthrose qui reproduit les signes observés chez l'humain.

Notre hypothèse est que la mutation de la matriline-3 contribue au développement de l'arthrose et des douleurs observés chez les patients. Les modèles cellulaires sont incomplets pour ce qui est d'étudier le développement de l'arthrose car ils sont dépourvus d'interaction avec l'environnement. A ce jour seules les données obtenues in vivo permettent d'intégrer l'ensemble des paramètres de la maladie.

Nous nous proposons d'étudier l'effet de la mutation T298M sur la dégradation du cartilage. C'est pour cela que nous nous proposons d'analyser les souris mutées dans le but de mieux comprendre son impact biologique et de proposer des cibles thérapeutiques.

Les souris porteuses de la mutation T298M ont été générées dans le cadre d'un projet européen. Elles sont viables et ont un phénotype articulaire normal. Elles nous seront livrées en nombre suffisant et en âge compatible avec le design de l'expérience pour atteindre les objectifs du projet. Le rôle de la mutation T298M sera testé sur un modèle d'arthrose induite chez des mâles âgés de 10 semaines (ce qui correspond à la fin de la croissance) par déstabilisation de l'articulation induite par méniscectomie. Elles ne recevront aucun traitement. Les effets cellulaires induits par l'opération sont extrêmement précoces (de 3 jours à une semaine), alors que l'impact sur les tissus est plus tardif (8 semaines). Il est donc nécessaire que l'euthanasie soit faite après 8 semaines après déstabilisation. Pour se faire nous aurons besoin de 20 animaux (10 animaux contrôle et 10 animaux mutés Matriline-3T298M. Afin de réduire au maximum le nombre d'animaux sans compromettre les résultats, nous pratiquerons la méniscectomie sur un seul des genoux de la souris, l'autre servant de contrôle. L'animal sera ainsi son propre témoin.

Après une période d'acclimatation dans des conditions d'hébergement prévoyant un environnement adapté et enrichi, chaque souris, recevra deux injections de Buprenorphine, (molécule opiacée) permettant le traitement de la douleur, la première sera faite 15 mn avant chaque intervention chirurgicale, la seconde six heures plus tard. L'acte chirurgical sera pratiqué sous anesthésie générale. Durant l'hébergement (8 semaines maximum), les souris seront hébergées 5 par cage de façon à favoriser l'expression de comportement de nidification. Les souris seront observées 3 fois par semaine pour rechercher tous signes de souffrance, tel que les modifications du comportement, poils hérissés et ternes, hypoactivité, prostration, vocalisations et boiterie. Elles seront pesées une fois par semaine afin de détecter une perte de poids anormale. Si un de ces signes était observé l'animal en question fera l'objet de dispositions particulières (injection d'antalgique par voie sous cutané, mise en place de nourritures plus accessible sous forme de gelée enrichie). Si ces signes persistent et/ou que l'animal perd 20% de son poids malgré les traitements antalgique l'animal sera alors retiré de l'expérimentation et euthanasié.

10334 L'impact de la nutrition sur le cerveau est un véritable enjeu de santé public puisque depuis quelques années, de nombreuses études montrent l'impact de nutriments comme les omégas 3 ou les polyphénols sur les troubles du comportement et de la mémoire. Afin de proposer des solutions de nutrition préventives à l'apparition de certains troubles ou pathologies, il est nécessaire de pouvoir étudier les effets fonctionnels et potentiellement bénéfiques des aliments et nutriments sur les fonctions cérébrales. Le laboratoire et sa cellule de transfert travaille sur ce sujet capital depuis de nombreuses années en collaboration avec des industriels afin d'évoluer vers une nutrition préventive et personnalisée. Ainsi la cellule de transfert propose des projets de recherche préclinique sur des modèles rongeurs pour tester l'impact santé du nutriment sur les fonctions cérébrales. Le modèle animal est indispensable car il s'agit d'évaluer les effets comportementaux et cognitifs d'une supplémentation nutritionnelle chronique en réalisant un panel de tests comportementaux. De plus, de nombreux biomarqueurs sont mesurés à l'issue de cette supplémentation via des approches biochimiques et moléculaires.

La cellule de transfert réalise donc des partenariats de recherche avec des industriels avec des délais de mise en application des projets assez courts. Cette présente demande vise donc à regrouper les contrats à venir sur une période de 3 ans portant sur l'étude de 1500 souris. En fonction du projet d'étude, différentes souches de souris, à différentes périodes de la vie peuvent être utilisés.

Le nombre d'animaux sera réduit au mieux grâce à l'utilisation de tests statistiques montrant la différence entre plusieurs groupes. L'étude de comportements de la mémoire et de type anxieux ne

peut être réalisée que sur animaux vivants ce qui rend impossible le remplacement de ceux-ci par des modèles in vitro. Toutes les précautions possibles seront prises afin de raffiner nos procédures et réduire au mieux la douleur (antalgiques avant anesthésie) et l'inconfort (manipulation régulière et enrichissement de l'hébergement) des animaux. Ainsi nous respectons l'obligation légale de la règle des 3R : Remplacer, Réduire et Raffiner.

10335 La décontamination de lignées de souris par transfert d'embryons permet de modifier le statut sanitaire des lignées et donc leurs conditions d'hébergement qui sont ainsi améliorées. Des souris hébergées dans des conditions d'animalerie conventionnelle sont exposées en permanence à des stimulations de leur système immunitaire par l'environnement (air, litière, nourriture, eau de boisson, personnes fréquentant l'animalerie). Ces stimulations ont forcément un impact sur les réponses immunitaires des animaux. Les études scientifiques qui portent sur des modèles de souris et qui s'intéressent à l'effet de mutation génétique sur les réponses immunes doivent s'affranchir des stimulations non contrôlées des animaux par leur environnement. La décontamination de ces lignées permet leur hébergement en animalerie protégée dans des conditions extrêmement contrôlées (air filtré, eau de boisson filtrée, nourriture irradiée, litière autoclavée, procédures strictes d'habillement et de circulation des personnes en contact avec les animaux). Cette technique de décontamination consiste à récupérer des embryons au stade morula ou blastocyste à partir de femelles des lignées concernées hébergées en animalerie conventionnelle. Ces embryons protégés par leur membrane pellucide de tout contaminant éventuellement présents chez leur mère doivent être lavés dans un milieu adéquat avant d'être réimplantés dans une femelle pseudo-gestante hébergée en animalerie protégée. Les femelles ainsi réimplantées donneront naissance à des souriceaux de la lignée à décontaminer. Ces souriceaux hébergés en animalerie protégée seront vérifiés par un contrôle sanitaire afin de prouver l'amélioration du statut de la lignée de départ et donc la décontamination. Cette technique nécessite divers groupes d'animaux : groupes de mâles fertiles et de femelles fertiles de la lignée à décontaminer pour la production d'embryons à décontaminer et groupe de mâles vasectomisés et groupe des femelles B6CBA pour la production de femelles pseudo-gestantes receveuses des embryons.

Ce projet utilise au total 530 souris.

Ce projet expérimental répond aux exigences des 3R. Le système immunitaire subit une éducation qui prend forme tout au long de la vie de l'animal ; son étude dans un contexte environnemental contrôlé nécessite le recours aux animaux. En effet, la décontamination de lignées par transfert d'embryons fait appel à des gestes techniques très simples. Des précautions particulières au moment des accouplements des souris permettent d'optimiser la technique : horaire de la mise en accouplement, horaire de la détection des bouchons vaginaux, mise en accouplement des mâles isolés de la lignée à décontaminer avec deux femelles de la lignée provenant de deux cages différentes, pas de change de litière des mâles à accoupler à l'approche de la date d'accouplement. Une attention particulière est également accordée lors de l'utilisation des embryons, qui sont maintenus dans les meilleures conditions possibles : milieux spécifiques M2 ou M16, incubation en présence de 6% de CO₂, manipulation délicate lors des lavages successifs. L'optimisation de la technique et l'expérience du professionnel réalisant les étapes sur animaux permet de réduire le nombre d'animaux au strict minimum pour assurer un transfert réussi d'embryons en nombre suffisant pour la pérennité de la lignée dans le nouvel environnement.

Les animaux sont élevés dans des conditions d'hébergement (température et hygrométrie de l'environnement, densité d'animaux, présence systématique d'enrichissement, change régulier de la litière, nourriture et eau ad libitum, surveillance quotidienne de l'état général des animaux) qui respectent leur bien-être. De plus, l'ensemble des procédures sera réalisé de manière à limiter le stress et la souffrance des animaux (anesthésie lors de la réimplantation des embryons, isolement des femelles après implantation dans des conditions d'hébergement avec enrichissement adapté aux femelles gestantes).

10336 Les lymphocytes B (LB) sont les cellules du système immunitaire qui permettent la défense de l'organisme en sécrétant des anticorps. Le développement des LB a lieu dans la moelle osseuse et est conditionné par l'expression de certains gènes. Parmi ces gènes, PAX5 est le garant de l'identité

des LB et est exprimé dès les stades précoces de leur développement. Chez l'Homme des altérations du gène PAX5 ont été décrites dans 38.9% des cas des leucémies des LB (leucémies aiguës lymphoblastique B, LAL-B) de l'enfant. Une de ces altérations est la mutation PAX5-P80R qui remplace la proline en position 80 par une arginine. PAX5-P80R représente 7% des LAL-B présentant une altération de PAX5 et chez les patients cette mutation est trouvée dans les cellules cancéreuses bien qu'absente dans les LB normaux. Notre projet a pour but de déterminer si la mutation PAX5-P80R est un évènement initiateur de la transformation tumorale des LB. Pour ce faire nous allons étudier des souris génétiquement modifiées dans lesquelles les LB expriment tous le mutant PAX5-P80R. Dans ces souris, nous caractériserons in vivo le développement des LB, nous analyserons la réponse immunitaire spécifique des LB et nous suivrons le développement tumoral des LB. Cette étude mettra en évidence l'impact de PAX5-P80R sur le développement et la fonction des LB ainsi que son potentiel cancérigène et permettra la meilleure compréhension de l'implication de cette mutation dans la LAL-B chez l'homme.

Ce projet utilise au total 158 souris et répond aux exigences des 3R, à savoir :

Remplacer Le développement des sous populations de lymphocytes B et de la réponse immunitaire mais aussi l'émergence de cancer sont conditionnés par les interactions entre les lymphocytes B et d'autres cellules dont celles localisées au sein des organes lymphoïdes (Moelle osseuse, rate, ganglions lymphatiques) ainsi leur étude est impossible dans une lignée cellulaire in vitro. Il existe une très forte homologie de structure et fonction entre les gènes d'immunoglobuline humaine et murins faisant de la souris un modèle expérimental incontournable pour l'étude du système immunitaire et des évènements oncogéniques aboutissant à des cancers des lymphocytes B, ainsi la souris est l'espèce de référence internationale pour l'étude des cancers des lymphocytes.

Réduire : 10 couples de souris seront accouplés pour générer 148 souris qui seront étudiées

Concernant les souris étudiées, 100 souris seront surveillées pendant 12 mois. 48 souris seront manipulées entre l'âge de 2 mois et l'âge de 4 mois au cours de 4 expériences indépendantes pendant lesquelles 6 souris PAX5-P80R et 6 souris contrôles seront utilisées.

L'utilisation de 6 souris par lot étudié permet de diminuer l'écart type entre les résultats obtenus et les manipulations répétées 4 fois de façon indépendante permet de déterminer la reproductibilité des données obtenues. Nous pourrions ainsi réaliser une analyse statistique des résultats.

Le nombre de 158 souris est le nombre de souris utilisées en dehors d'imprévu.

Raffiner : les animaux sont élevés dans des conditions d'hébergement (température et hygrométrie de l'environnement, densité d'animaux, présence systématique d'enrichissement, change régulier de la litière, nourriture et eau ad libitum, surveillance quotidienne de l'état général des animaux) qui respectent leur bien-être. Les souris seront surveillées quotidiennement pour détecter des signes de souffrance (poils hérissés, dos courbé, isolement, blessures, perte de poids). Toute souris présentant une souffrance sera traitée par analgésie. En cas de blessure, les souris seront séparées et traitées par application d'une pommade cicatrisante. En cas de signe en faveur de l'émergence d'une tumeur, les souris concernées seront attentivement observées et palpées et traitées par analgésiques en cas de signe de souffrance. Les souris seront euthanasiées 21 jours après détection de la tumeur. Si la taille de la tumeur (solide) atteint 5% du poids de la souris alors elles seront euthanasiées. Si le traitement analgésique ne suffit pas à atténuer les signes après 3 jours, les souris seront euthanasiées. La rate et la moelle osseuse seront alors prélevées pour analyser les lymphocytes normaux et cancéreux et pour extraire les ARN. Les euthanasies seront réalisées au CO2 (appareil Quietec).

10337 Les tumeurs osseuses ont pour caractéristiques une abondante matrice extracellulaire de nature chondrogénique ainsi que l'absence de vascularisation limitent la diffusion de molécules thérapeutiques jusqu'au tissu tumoral, faisant de ces tumeurs, des tumeurs chimio- et radio-résistante. Le seul traitement efficace à ce jour reste la chirurgie qui possède un taux de survie à 10 ans de seulement 29 % en cas de rechute et dans les formes les plus graves. Pour pallier ce problème, notre unité développe une nouvelle stratégie thérapeutique bispécifique qui vise à exploiter les deux caractéristiques du microenvironnement tumorale, à savoir une matrice extracellulaire riche en protéoglycanes et un tissu hypoxique, afin d'adresser, de façon spécifique, des molécules thérapeutiques jusqu'à leur cible. Pour cela, une prodrogue activable en hypoxie et

vectorisée vers les protéoglycanes par un vecteur spécifique a été synthétisée par notre équipe de chimistes et sélectionnée sur la base de son activité in vitro.

Les objectifs de cette étude seront : 1- Mettre au point un modèle orthotopique dérivé de cellules humaines implanté en position paratibiale chez des souris immunodéprimées de type NMRI-NUDE (Foxn1nu /Foxn1nu). 2-De caractériser le microenvironnement de ces tumeurs par des études d'imageries in vivo (Imagerie scintigraphique, Imagerie fluorescente, IRM) 3- de déterminer l'efficacité antitumorale de cette molécule, comparativement (i) à son équivalent non vectorisé, (ii) à un équivalent vectorisé mais non activable en hypoxie, (iii) à une prodrogue de référence, (iv) à un groupe contrôle. L'efficacité antitumorale des prodrogues seront déterminé grâce à un suivi longitudinal du volume tumoral par Imagerie à Résonance Magnétique (IRM) dû à la localisation intramusculaire des tumeurs rendant leur détection et leurs mesures difficiles. 4-de déterminer les effets indésirables que les molécules peuvent engendrer : variation du poids des souris, Analyses sanguines (NFS), suivit de l'état général des souris.

3- de caractériser l'activité anticancéreuse sur les tumeurs prélevées à différents stades. Pour cela, un total de 141 animaux sera nécessaire.

Le protocole proposé s'inscrit dans le respect de la règle des 3R (Remplacement, Réduction, Raffinement) pour l'expérimentation animale. Ces travaux ne pouvant s'effectuer que sur un organisme entier, le nombre d'animaux a été préalablement réfléchi afin de limiter le nombre d'animaux utilisés. Concernant le Raffinement, les protocoles ont été optimisés afin de garantir de bonnes conditions physiques à l'animal au cours des procédures (anesthésie afin de prévenir le stress, administration d'antalgiques, tapis chauffants, cage de récupération) une surveillance quotidienne des animaux sera réalisée en surveillant les points limites (Perte de poids >20%, Œil clos.). Toute observation d'un de ces point limites conduira à la sortie de l'animal du protocole et à son euthanasie. Cette décision sera prise par le responsable du projet.

Au final, ces études précliniques devraient permettre de valider la double approche de sélectivité pour la prise en charge thérapeutique de ce type de cancer.

10338 Depuis plusieurs années la lutte contre le diabète a conduit à la mise sur le marché de multiples molécules antidiabétique comme le produit produit Jardiance.

Cette pathologie du diabète, est associée à de nombreuses complications dans divers organes comme l'œil ou des rétinopathies sont observées mais aussi au niveau des muscles striés squelettiques. En effet dans les cas les plus graves, ces anomalies dans les muscles striés squelettiques peuvent conduire à une amputation des membres. La lutte contre le diabète implique donc de développer des molécules permettant de réduire les complications et notamment au niveau des muscles striés squelettiques.

Dans ce contexte, les responsables de ce projet souhaitent étudier l'impact d'une nouvelle classe de molécule antidiabétique sur le métabolisme énergétique et la microcirculation sanguine dans le muscle strié squelettique.

Ces études nécessitent l'utilisation de modèles animaux élaborés capables de reproduire les altérations physiologiques rencontrées dans les pathologies humaines et notamment le diabète. Les modèles alternatifs (cultures cellulaires in vitro, modélisation in silico) fournissent des informations trop limitées et ne peuvent reproduire toute la complexité d'un organisme vivant.

De plus, l'expérimentation directe chez l'homme, sans l'obtention préalable d'informations chez l'animal, n'est pas envisageable. Cette étape chez l'animal permettra donc d'obtenir des informations préalables et précieuses à l'élaboration d'essais précliniques qui à termes auront une finalité clinique chez l'homme.

Lors de cette étude, il est donc proposé d'utiliser, dans le respect de l'éthique et du bien-être animal, des modèles animaux élaborés qui reproduisent les étapes d'installation et d'entretien du diabète.

En accord avec la règle des 3R, les responsables de ce projet s'attachent à proposer des méthodes d'expérimentation totalement non invasives et aussi raffinées que possibles pour soulager au maximum l'inconfort des animaux. Dans ce projet les méthodes d'expérimentation reposent sur des techniques d'imagerie médicales totalement non invasives et indolores pour les animaux. Lors des protocoles nécessitants l'anesthésie des animaux, un gel ophtalmique sera appliqué afin de prévenir tout dessèchement des yeux. Dans un souci de réduire, supprimer ou soulager l'inconfort,

la douleur ou l'angoisse subis par les animaux, ceux-ci sont suivis quotidiennement par le même manipulateur et les mêmes animaliers.

Le nombre d'animaux par lot devra être suffisant pour ne pas avoir à recommencer l'expérience et réaliser des tests statistiques (Mann-Whitney ou Anova). Pour mener à bien ce projet, nous envisageons une expérimentation sur un total de 70 rats ZDF.

10339 1. Objectif scientifique du projet

Les poissons présentent différents types de nage qui peuvent être classés en trois catégories en fonction de la durée de l'effort, des muscles sollicités et des substrats énergétiques utilisés. La nage aérobie (besoin de dioxygène) soutenue correspond à un effort endurant du poisson sur une longue période sans fatigue musculaire. Elle peut être observée lors d'exploration de l'habitat ou durant les migrations. Le second type de nage correspond à un effort intense de courte durée de type sprint. Elle est typiquement rencontrée pendant les périodes d'accélération, au cours desquelles la nage est instable, comme par exemple un départ rapide lors de la réponse de fuite face à un prédateur (activité anaérobie ne nécessitant pas de dioxygène). Entre ces 2 extrêmes, il y a la nage prolongée. D'une période moins longue que la nage aérobie soutenue, elle implique le recrutement de tous les types de fibres musculaires et donc l'utilisation du métabolisme aérobie et anaérobie.

C'est cette gamme de nage que nous nous proposons d'étudier, en faisant nager les poissons contre un courant d'intensité variable. Nous suivrons un protocole préalablement mis au point par une experte en locomotion et en métabolisme des poissons. La consommation d'oxygène est mesurée au cours de cet effort ainsi que lors d'une période de récupération grâce à un respiromètre de nage.

L'objectif ici est d'estimer et de comparer les capacités de nage de différents lots de poisson zèbre, *Danio rerio* : des individus témoins et deux lots différents d'individus chez lesquels un gène impliqué dans le développement du tissu musculaire a été invalidé. Le poisson zèbre est un modèle pertinent pour étudier le tissu musculaire car la structure du muscle est conservée entre l'Homme et le poisson zèbre. La fonction de nombreuses protéines des muscles squelettiques est également conservée entre l'Homme et le poisson zèbre. Le poisson zèbre possède également tous les avantages d'un organisme modèle de laboratoire.

2. Retombées attendues

Mieux comprendre les conséquences de l'invalidation d'un gène sur les capacités de nage, chez le poisson zèbre adulte, pourrait permettre à terme de confirmer le lien entre les gènes étudiés et le développement potentiel d'une myopathie chez l'Homme et d'en comprendre les mécanismes.

3. Conformité par rapport aux exigences de remplacement, de réduction et de raffinement

Remplacement : il n'existe pas à l'heure actuelle de système *in vitro* capable de mimer tous les processus complexes mis en place au cours de la nage. L'étude de la nage nécessite donc l'utilisation d'un modèle animal.

Réduction : le nombre de poissons utilisés dans ce projet est réduit au maximum afin de tirer des conclusions ayant une signification statistique.

Raffinement : des points limites sont fixés afin de réduire la souffrance des animaux qui est évaluée à un niveau très léger. Ainsi, tout poisson présentant des signes généraux évocateurs de mal-être sera euthanasié.

4. Nombre total d'animaux inclus dans ce projet

4 lots différents de 15 poissons (poissons sauvages et poissons invalidés respectivement pour différents types de collagène) soit 60 poissons zèbres adultes au total seront utilisés pour effectuer ces tests de nage.

10340 La tomographie par émission de positons (TEP) est une technique d'imagerie fonctionnelle utilisée en routine en oncologie générale. Son intérêt est grandissant dans la prise en charge des tumeurs cérébrales, tant d'un point de vue diagnostique, que du suivi thérapeutique. L'arrivée de nouveaux radiotraceurs plus adaptés à la neuro-oncologie, notamment les traceurs des acides aminés, ne fait qu'accroître son intérêt dans cette indication. Le RANO (the Response Assessment in Neuro Oncology) recommande depuis 2017 l'usage de l'imagerie TEP par des acides aminés radiomarqués en complément de l'IRM conventionnel. En effet, les capacités diagnostiques de l'IRM

sont limitées et ne permettent pas de prédire efficacement l'agressivité et l'hétérogénéité tumorale impactant sur le diagnostic et le traitement de ces pathologies. La tumeur cérébrale la plus agressive et présentant l'espérance de vie la plus faible est le glioblastome (Gliome de grade IV). Cette tumeur de haut grade, présente de nombreux types et sous types caractérisés par des mutations génétiques différentes (classification OMS, 2016), impactant directement le pronostic de ces tumeurs. Parmi ces mutations, la mutation IDH1 est la plus connue et la plus étudiée. Il a été démontré que les patients porteurs de cette mutation possèdent un meilleur pronostic avec une amélioration significative de la réponse aux traitements par chimiothérapie. Il est donc indispensable de mieux connaître les profils de fixations de nos radiotraceurs dans les tumeurs cérébrales IDH1 mutées ou non mutées, afin de développer l'imagerie TEP dans la prise en charge de ces gliomes. Les résultats de cette étude permettront d'apporter aux cliniciens un outil d'intérêt prédictifs, c'est-à-dire décisionnels sur le plan thérapeutique du patient.

Ce projet a pour objectif de caractériser en imagerie TEP-IRM le glioblastome par des radiotraceurs du métabolisme (18F-FDG, 18F-FDopa, 11C-méthionine) et de l'inflammation (18F-DPA714) et également par un traceur de l'angiogenèse (68Ga-NODAGA-RGD) après greffe intracérébrale chez le rat ; en étudiant particulièrement l'impact de la mutation IDH1.

Pour cette étude d'imagerie, il sera réalisé une greffe intracérébrale chez 104 rats nus, repartis en 2 groupes selon le profil génétique IDH1 :

-52 rats avec une greffe d'une lignée cellulaire de glioblastome non muté pour le gène IDH1

-52 rats avec une greffe d'une lignée cellulaire de glioblastome muté pour le gène IDH1

Dans ce cas d'étude, le remplacement des expérimentations animales par des méthodes alternatives est impossible puisque l'utilité même d'un radiotraceur est de permettre un suivi in vivo. Le potentiel diagnostique des 5 radiotraceurs sera évalué sur le même animal, ce qui permettra de diminuer considérablement le nombre d'animaux (Réduction). De même, l'IRM permettra de s'assurer que la taille cible de la tumeur est atteinte afin de ne pas inclure d'animaux non exploitables dans le protocole (Réduction). Enfin, en conformité avec la règle des 3R, le bien-être des animaux fera l'objet d'un suivi quotidien, les rats seront anesthésiés pour l'ensemble des procédures (implantation de la tumeur, imagerie IRM-TEP), et euthanasiés dès lors que l'un des points limites sera atteint (Raffinement).

10341 La stéatohépatite est une maladie du foie liée à l'obésité (également appelée NASH), dans laquelle le foie présente un excès de gras à l'origine d'une inflammation. Cet état peut devenir irréversible et évoluer vers une cirrhose ou un cancer hépatique. Il s'agit de la cause d'hépatite la plus répandue et son origine principale est une alimentation mal équilibrée, riche en graisse et en sucre. Il existe des différences liées au sexe dans l'apparition et l'évolution de cette maladie qui sont encore mal connues. Nous nous proposons d'étudier le rôle de protéines impliquées dans le métabolisme des graisses en utilisant des souris génétiquement modifiées afin de comprendre les mécanismes de protection des femelles. Nous utilisons des animaux vivants car l'étude des maladies métaboliques telles que la stéatohépatite implique la nécessité entre autres d'explorer les dialogues inter-organes (tissu gras-foie, muscle-foie, etc.). Pour mener à bien notre expérience (étude d'un effet sexe, du transgène et du régime), il est nécessaire d'utiliser des animaux mâles et femelles, transgéniques (2 transgènes différents) et leur contrôle non modifié, ainsi qu'un régime contrôle pour le comparer au régime gras et sucré, induisant la maladie. Chaque lignée transgénique possède son propre contrôle non muté, issu des mêmes parents, couramment appelé 'littermate' (issu de la même litière). Ainsi, 192 souris seront utilisées, réparties en différents groupes, un nombre suffisant et nécessaire pour obtenir des résultats interprétables de façon fiable. Des mâles et des femelles, transgéniques ou non, seront hébergées en locaux d'animalerie appropriés, leur apportant les meilleures conditions de bien-être et de santé, et recevront un régime riche en graisses et en sucre, dit "Western Diet" pendant 16 semaines, en comparaison d'animaux nourris avec un régime standard. Un suivi hebdomadaire de la consommation calorique et hydrique, de poids ainsi qu'un prélèvement de sang à 8 semaines, et un test de tolérance au glucose à 12 semaines permettront d'évaluer l'évolution de la maladie. L'administration d'un régime gras n'implique pas de douleur, néanmoins les animaux sont surveillés quotidiennement par les soigneurs ou concepteur. En fin

d'expérience, les animaux seront euthanasiés afin de prélever du sang et des organes d'intérêt (foie, tissus adipeux et intestin) pour des explorations moléculaires et biochimiques.

10342 Contexte :

La perte des gaines de myéline entourant les axones dans le cerveau et la moelle épinière provoque de graves troubles locomoteurs et de lourds handicaps. Ces pathologies démyélinisantes, telle que la sclérose en plaques, sont causées par des problèmes de conduction nerveuse le long des axones, entraînant des troubles du mouvement, de la vision, de la mémoire, et pouvant aller jusqu'à un handicap irréversible, pour lequel aucun traitement médical efficace n'est disponible. L'objectif principal de ce projet est de comprendre le rôle d'une protéine issue du gène ADAM10. Cette protéine est située dans la membrane des cellules et appartient à une famille de protéines capables de protéger les gaines de myéline et de stimuler la formation de nouvelles gaines. Le projet consiste à analyser les conséquences de l'absence de ce gène et donc de la protéine chez la souris. Pour ce projet, nous utiliserons des souris transgéniques invalidées pour ce gène spécifiquement dans certaines cellules du cerveau responsables de la mise en place et du maintien de la myéline.

- Il s'agira de constituer un élevage de souris transgéniques avec phénotype potentiellement dommageable au niveau locomoteur. L'invalidation d'ADAM10 sera induite par traitement médicamenteux dans l'eau de boisson des mères gestantes pour l'étude des embryons ou allaitantes pour l'étude des nouveaux nés et par injection intrapéritonéale pour les adultes, cela ne doit pas entraîner de souffrance, les souris seront particulièrement surveillées, des antalgiques sont prévus si nécessaire ainsi que des points limites spécifiques ; pour leur confort, les cages des souris seront enrichies.

- A partir de P30, quand les souris ont développé des capacités locomotrices quantifiables, ainsi qu'à l'âge adulte, les souris transgéniques subiront des tests comportementaux : test de marche sur poutre pour évaluer la qualité de la coordination locomotrice ; test de rotarod pour évaluer la qualité générale de l'équilibre, de la coordination sensorimotrice, de l'endurance et de l'apprentissage moteur et le couloir d'analyse des troubles de la marche et de l'équilibre pour mettre en évidence de façon plus précise les troubles de la coordination lors de la marche.

- Des cellules du cerveau (modèle in vitro) et des tranches de cervelet (ex vivo) seront mises en culture à partir de souris âgées de P3 ou P10 respectivement. L'utilisation de ces modèles simplifiés nous permettra d'identifier les cibles de ce gène, et de mieux comprendre le rôle de la protéine dans la myélinisation.

- Certaines souris subiront une perfusion intracardiaque pour analyses histologiques des tissus d'intérêt en post-mortem. Cette procédure sera réalisée sous anesthésie générale très profonde pour éviter toute douleur aux animaux.

Au total nous avons donc besoin de 3040 animaux pour une étude qui s'étend sur 5 ans. Afin d'être en conformité avec les exigences des 3R, nous allons utiliser le minimum d'animaux en expérimentation en prélevant le maximum de tissus biologiques sur chaque animal et en utilisant les tests statistiques appropriés afin d'obtenir des résultats statistiquement exploitables. La qualité de la mise en place de la gaine de myéline et de son maintien a des conséquences fonctionnelles qui nécessitent l'analyse de composantes locomotrices propres aux animaux vigiles. Nous allons également raffiner l'étude en évitant des tests comportementaux douloureux, en réduisant la durée de l'étude au maximum et en appliquant des points limites, prévoyant l'euthanasie des souris en cas de souffrance majeure. Les animaux disposeront de coton pour enrichir leur environnement.

Une meilleure compréhension de l'importance de cette protéine permettrait le développement de nouvelles pistes thérapeutiques pour le traitement de maladies démyélinisantes, telle que la sclérose en plaques.

10343 La broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) est une maladie le plus souvent liée au tabagisme. En France, la BPCO concerne 4 millions de personnes et elle sera bientôt la 4ème cause de mortalité. Cette maladie se caractérise notamment par une fibrose bronchique et péri-bronchique, et par un emphysème, c'est-à-dire une destruction des alvéoles, associés à un déclin irréversible de la fonction respiratoire. Les mécanismes de ce remodelage sont mal compris, et ce processus n'est pas ciblé par les thérapeutiques actuelles. Nous souhaitons mettre en place au

laboratoire un modèle de souris BPCO, qui reproduise les lésions emphysémateuses, dans lequel les souris seront traitées par des instillations intranasales d'élastase. Pour le moment dans ce type de protocole, l'analyse de la fonction ventilatoire des animaux est réalisée à la fin du protocole sur souris anesthésiées et trachéotomisées, et il est donc impossible d'effectuer des études longitudinales dans notre modèle. Nous avons récemment mis au point et validé la technique d'intubation pour la mesure de la fonction respiratoire. Le but de ce projet est de mettre en place et valider le modèle d'emphysème induit par l'élastase, puis d'effectuer le suivi de la fonction respiratoire des souris incluses dans ce protocole grâce à la technique d'intubation.

Nous pensons que la réalisation de ce projet permettra d'offrir de nouvelles perspectives thérapeutiques pour le traitement de la BPCO. Pour ce faire, 150 souris seront utilisées.

Afin de respecter la règle des 3R (réduire, raffiner, remplacer), les mesures mises en place sont les suivantes :

1) Réduire : se souciant de réduire le nombre des animaux en expérimentation, nous avons calculé le nombre de souris minimal par groupe pour obtenir des résultats significatifs, et nous réaliserons de multiples études ex vivo sur différents organes et selon différentes techniques.

2) Raffiner : pour diminuer la souffrance et l'anxiété des animaux, des dispositifs sont prévus (anesthésie pour les intubations et les prélèvements, analgésie locale pour les prélèvements, raffinement des conditions d'hébergement, vérification par le comité sur le bien-être des animaux) et nous avons soigneusement décrit des points limites en relation avec notre protocole (critères de perte de poids, comportement anormal ou difficulté respiratoire).

3) Remplacer : il n'existe pas de modèle in vitro actuellement permettant d'étudier la pathophysiologie de la BPCO, maladie complexe touchant plusieurs composants (tels que le muscle lisse bronchique, l'épithélium et les cellules inflammatoires) et mettant en jeu plusieurs organes (moelle osseuse, compartiment vasculaire et poumon). Grâce à un modèle de souris BPCO et la mise en place de cette nouvelle méthode d'analyse de la fonction respiratoire de façon non invasive, nous pouvons envisager une meilleure compréhension des phénomènes.

10344 1) Objectif éducatif du projet

L'enseignement de la physiologie cardiovasculaire occupe une place importante dans le parcours Physiologie de la Licence Sciences, Technologies, Santé, mention Sciences de la Vie. Dans le cadre du semestre de spécialisation de la 3^{ème} année de ce parcours, une Unité d'Enseignement intitulée « Physiologie Cardio-Respiratoire » est proposée aux étudiants.

Les maladies cardiovasculaires, première cause de mortalité dans le monde, et l'hypertension artérielle, important facteur de risque de leur survenue, sont parmi les thèmes principaux développés dans le cadre des enseignements théoriques dispensés dans cette UE. La physiologie est une discipline expérimentale et l'enseignement sous forme de Travaux Pratiques offre de multiples intérêts en complément des cours magistraux. Le TP d'exploration fonctionnelle de la régulation de la pression artérielle a ainsi pour objectifs ;

- d'illustrer, à l'échelle de l'organisme entier, les composantes nerveuse et hormonale de la régulation de ce paramètre fondamental de la physiologie cardiovasculaire en identifiant clairement ses aspects cardiaque et vasculaire,

- de grandement faciliter, de l'avis même des étudiants, la compréhension et l'apprentissage de ces notions de physiologie intégrée dans un contexte éducatif et scientifique maîtrisé,

- d'appréhender la variabilité des réponses chez les sujets vivants, le plus souvent occultée durant les enseignements théoriques,

- d'« exposer » les étudiants volontaires à une expérimentation sur un animal vivant afin de les sensibiliser à cette question en prévision de leur poursuite d'étude dans les filières de recherche en Physiologie.

Une séance de Travail Dirigé est réalisée en préambule à la séance de TP afin de présenter et expliquer aux étudiants du parcours Physiologie le cadre réglementaire en vigueur pour ce type d'expérimentation et pour les sensibiliser à la règle des 3R et au bien-être animal. Ce TD préparatif est suivi d'un questionnaire dont la validation est un prérequis obligatoire à la présence au TP.

2) Conformité/exigences de remplacement, de réduction et de raffinement

Remplacement : La mesure par télémétrie de la pression artérielle de l'animal constitue une alternative moins invasive à celle qui est réalisée par voie sanguine durant cette séance de TP. Cette technique nécessite cependant un investissement financier incompatible à ce jour avec le budget de la plateforme pédagogique. La suppression des TP portant sur la régulation de la pression artérielle chez le lapin des parcours de Licence autre que le parcours Physiologie, afin de réduire le nombre d'animaux utilisés (voir le paragraphe suivant), nous oriente vers d'autres pratiques pédagogiques qui évitent le recours à l'animal pour illustrer la régulation de ce déterminant de la physiologie cardiovasculaire. Le développement et la maîtrise de ces outils d'enseignement alternatifs, comme la simulation informatique par exemple, doivent nous permettre de remplacer en grande partie nos TP sur animaux vivants pour réduire encore d'avantage leur utilisation.

Réduction : Depuis 2004 et la mise en place du système « Licence-Master-Doctorat », l'équipe pédagogique de Physiologie a choisi de ne pas proposer de Travaux pratiques en première année de Licence et à les limiter au maximum en seconde année (4 séances de TP proposées en L2 dont une en simulation informatique et aucune sur animal vivant). Longtemps proposée dans plusieurs parcours de Licence qui traite de physiologie cardiovasculaire, la séance de TP portant sur la régulation de la pression artérielle chez le lapin est désormais « réservée » au semestre de spécialisation du parcours Physiologie de la 3ème année. La suppression des séances de TP des parcours de Licence autre que le parcours Physiologie permet de réduire de 30% les animaux utilisés.

Raffinement : L'anesthésie générale est réalisée par l'enseignant au sein de l'animalerie avant le transport de l'animal dans la salle de TP et le début de la séance avec les étudiants. Elle est maintenue sans réveil de l'animal durant toute la séance et une anesthésie locale est également pratiquée pour faciliter la préparation de l'animal. La qualité de l'anesthésie générale est constamment vérifiée par l'absence de toute réactivité du lapin et par l'absence de réflexes. Le nombre de lapins utilisés dans la procédure expérimentale associée à ce TP est réduit au maximum (3 animaux par séance pour 12 étudiants) tout en permettant les apprentissages sans pour autant mettre en péril le bien-être de l'animal. Les pratiques expérimentales proposées sont toutes d'une classe de gravité légère et des points limites ont été définis afin d'éviter toute souffrance de l'animal. Les animaux retenus pour cet enseignement pratique sont sélectionnés par le responsable du « bien-être animal » de l'animalerie. Les animaux restent anesthésiés jusqu'à leur euthanasie (pas de réveil à la fin de la séance de TP) et il est proposé aux étudiants d'utiliser un cadavre pour détailler l'anatomie de l'animal.

3) Nombres d'animaux

Environ 180 étudiants sont inscrits chaque année dans l'UE de « Physiologie Cardio-Respiratoire » de la 3ème année du parcours Physiologie. Le département de Biologie accorde un sur encadrement pour les TP concernant l'expérimentation animale de 1 enseignant pour 8 étudiants (au lieu de 1 pour 18 pour les TP sans sur encadrement). Pour l'UE « Physiologie Cardio-Respiratoire », chaque séance de TP est donc organisée pour 12 étudiants et 3 animaux sont utilisés par séance. Le nombre d'animaux utilisés au total dans le cadre de ce projet est donc de 45 lapins pour ce TP.

10345 La septicémie est une réponse inflammatoire généralisée d'origine infectieuse caractérisée par au moins deux des symptômes suivants : fièvre ou hypothermie, respiration et rythme cardiaque accélérés, augmentation ou diminution du nombre de globules blancs du sang. La septicémie s'accompagne d'une production exacerbée de molécules pro-inflammatoires et de radicaux libres. Malgré les progrès dans la thérapie antibiotique, la septicémie reste encore une importante cause de mortalité dans le monde. Elle affecte principalement les individus déjà fragilisés, les nouveau-nés et les personnes âgées. Dans les pays industrialisés, elle représente autant de décès que l'infarctus du myocarde, alors que dans les pays en développement, la septicémie tue 6 millions de nourrissons par année. En France, la mortalité des patients atteints d'une septicémie est de 27 %, mais la mortalité de la forme la plus grave (choc septique) peut atteindre 50 %. Les projections suggèrent un doublement du nombre de cas d'ici cinquante ans en raison du vieillissement de la population.

Dans la plupart des cas, il s'agit d'une infection par des bactéries présentes naturellement dans l'organisme (la plupart du temps dans l'intestin) mais qui deviennent toxiques quand elles sont présentes dans le sang ou dans la cavité péritonéale.

Le choc septique est associé à un stress oxydatif sévère, une inflammation et une défaillance du système vasculaire qui induit des anomalies aux niveaux de multiples organes.

A l'heure actuelle, très peu d'options thérapeutiques existent afin de limiter les dégâts de la septicémie chez les patients, le traitement de choix étant l'antibiothérapie associée parfois à des corticostéroïdes. De nouveaux concepts doivent donc être élaborés.

Afin de contrecarrer les effets associés au choc septique, nous proposons d'utiliser des antioxydants, tels que la vitamine C ou la vitamine E ainsi que l'adénosine pour réduire l'inflammation. Cependant, ces molécules ont une faible durée de vie dans la circulation sanguine car elles sont rapidement dégradées.

Pour contourner ces limitations nous avons développé des nanomédicaments à base de squalène, un lipide naturellement présent dans l'organisme et donc bien toléré. L'encapsulation des principes actifs dans ces nanostructures à base de squalène permet d'une part la protection du principe actif (dans notre cas l'adénosine, la vitamine C et E) d'une dégradation précoce dans la circulation sanguine et d'autre part une meilleure pénétration dans les cellules.

Nous avons développé des nanoparticules multi-drogues chargées avec des antioxydants et de l'adénosine. Les premiers tests *in vitro* effectués avec ces NPs ont montré un fort potentiel antioxydant sur des cellules soumises à un stress. Les études *in vivo* nous permettront d'évaluer un effet au niveau de l'organisme entier mais également de tenir compte de la réponse immunitaire. Le passage à un modèle animal est incontournable car nous travaillons sur un modèle intégratif qui implique différents mécanismes (réaction inflammatoire, surproduction de radicaux libres, formation de caillots sanguins dans les vaisseaux) conduisant à une défaillance globale des organes.

Nous proposons dans ce projet d'évaluer l'effet protecteur de ces nanomédicaments dans un modèle murin de choc septique induit par injection de LPS (lipopolysaccharides) qui est une endotoxine pyrogène. Nous estimons à 280 le nombre de souris nécessaires pour ce projet.

Cet effectif a été déterminé en tenant compte de la règle des 3R. Remplacement car les expériences préliminaires réalisées *in vitro* nous ont permis de sélectionner les doses de nanomédicaments ainsi que les meilleures formulations à tester sur les animaux. Le passage à un modèle animal à ce stade est incontournable car le sepsis est un modèle intégratif qui implique différents mécanismes (réaction inflammatoire, surproduction de radicaux libres, formation de thrombi dans les vaisseaux) conduisant à une défaillance globale des organes. Réduction, car (i) les tests préliminaires d'efficacité ont été effectués *in vitro* sur des cellules ; (ii) le nombre d'animaux a été calculé au plus juste grâce à un test de puissance afin de garantir la validité statistique de l'étude. Raffinement, car un examen clinique rapproché sera mis en place et permettra de suivre la progression de la maladie tout en respectant les exigences en matière de bien-être animal. Du coton et des gels contenant des nutriments et de l'eau seront mis à disposition dans les cages pour favoriser la nidification et faciliter l'accès à la nourriture. Des points limites suffisamment précoces seront fixés pour réduire au minimum toute douleur, souffrance ou angoisse que pourraient ressentir les animaux.

Bénéfices attendus : cette étude nous permettrait d'évaluer et de valider dans un modèle de choc septique des nanomédicaments multi-drogues avec comme objectif un effet anti-inflammatoire et antioxydant et comme conséquence globale une protection multi organes et une meilleure survie.

10346 Le diabète de type 2 (DT2) est un dysfonctionnement pathologique complexe qui affecte la sécrétion et / ou l'action de l'insuline. Il existe des formes monogéniques de diabète de type 2 appelées « Maturité Début du Diabète du Jeune » (MODY) caractérisées par des défauts de sécrétion d'insuline. Parmi les formes monogéniques de diabète de type 2, MODY3 est la forme la plus répandue (environ 60% de toutes les formes monogéniques de diabète). MODY3 est lié à des mutations du facteur de transcription HNF1A. La déficience de ce gène conduit à un défaut de sécrétion d'insuline via un mécanisme moléculaire encore mal connu. Chez les patients MODY3, la sévérité du défaut de sécrétion d'insuline, et donc de la maladie, peut être extrêmement variable même au sein d'une même famille. Ceci indique que des gènes modificateurs peuvent contrôler

l'apparition de la maladie. Le diabète étant une maladie complexe, seule l'expérimentation animale nous permettra de comprendre les mécanismes sous-jacent à ce type de diabète.

Il existe un modèle de souris génétiquement modifiées pour lequel le gène HNF1alpha est absent : il a été démontré que certaines lignées de souris ne deviennent pas diabétiques malgré cette absence. Une analyse du génome a permis d'identifier une région chromosomique majeure qui est associée à cette suppression du diabète. Les gènes identifiés dans cette région, pourraient avoir un rôle dans le maintien de la barrière intestinale.

Afin de comprendre le rôle de cette région chromosomique, nous ferons des tests de tolérance au glucose et des gavages avec une molécule plus ou moins perméable à la barrière intestinale. Des prélèvements sanguins seront effectués sous anesthésie. Enfin, les souris seront euthanasiées pour prélèvement d'organes, afin d'étudier les lésions pancréatiques et intestinales.

Le nombre de souris utilisé sera de 320.

Afin de respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux sera réduit au minimum. Nos études précédentes ont montré que la validité de l'analyse statistique 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 par lignée). De plus, afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux, les procédures se feront avec une surveillance journalière. Les conditions d'élevage et d'hébergement seront effectuées dans le but d'augmenter autant que possible le bien-être des animaux (soins, enrichissement du milieu). Enfin des points limites ont été établis entraînant l'euthanasie anticipée de l'animal si nécessaire.

A terme, ce projet d'une durée de 5 ans, devrait nous permettre de comprendre les mécanismes de suppression du diabète de type MODY3. Il pourrait permettre le développement de nouveaux médicaments permettant de prévenir ou de freiner le développement de la maladie chez les patients.

10347 Chaque année, la mortalité liée à une cause cardiovasculaire touche environ 17 millions de personnes dans le monde. Une proportion importante de ces décès est liée à un arrêt cardiaque soudain, dont l'incidence en dehors du milieu hospitalier atteint 50 à 100 individus pour 100.000 habitants dans les pays industrialisés. En France, la mortalité liée à cette affection est très importante avec environ 40.000 décès chaque année. L'objectif principal de la prise en charge initiale de l'arrêt cardiaque consiste à réanimer les patients le plus vite possible à l'aide d'un massage cardiaque. Malgré une prise en charge souvent très rapide, seulement 40% des patients sont finalement réanimés avec succès et la majeure partie d'entre eux présente alors de graves séquelles. Ces séquelles, d'ordre neurologiques et cardiaques, sont d'autant plus sévères que la réanimation cardio-pulmonaire a été tardive ou prolongée. L'un des enjeux majeurs de la recherche biomédicale dans le domaine de l'arrêt cardiaque consiste donc à développer de nouveaux dispositifs capables d'améliorer l'efficacité du massage cardiaque et in fine d'améliorer les chances de réanimation et le pronostic neurologique.

Deux méthodes principales sont aujourd'hui envisagées pour l'amélioration de l'efficacité du massage cardiaque. La première consiste en une ventouse positionnée sur le thorax pour permettre un massage cardiaque à décompression thoracique active (RescuePump) et le second est un petit dispositif positionné à l'embouchure de la sonde endotrachéale au cours du massage cardiaque (RescuePod). Le RescuePod crée une résistance à l'entrée de l'air qui a pour effet de créer une légère dépression dans le thorax lors de chaque décompression thoracique. Ces deux méthodes ont montré un bénéfice sur le retour veineux pendant le massage cardiaque qui contribue à l'amélioration du débit de sang propulsé pendant le massage cardiaque.

Dans cette étude, notre objectif est donc d'évaluer et de comparer l'efficacité du RescuePod et RescuePump dans un modèle d'arrêt cardiaque chez le porc. Le critère d'efficacité primaire de l'étude sera la pression de perfusion cérébrale. Cette pression sera mesurée en continue par un cathéter de pression intracrânienne implanté chirurgicalement. Les dispositifs étudiés seront comparés entre eux, ainsi qu'à un massage cardiaque conventionnel et à l'assistance circulation extracorporelle (ACE). Cette dernière méthode a en effet démontré une efficacité maximale vis-à-vis de l'hémodynamique cérébrale au cours du massage cardiaque. 5 groupes d'animaux seront comparés (groupe témoin, groupe RescuePod, groupe RescuePump, groupe

RescuePod+RescuePump et groupe ACE). Pour chaque groupe, les animaux seront anesthésiés et, après l'induction d'une fibrillation ventriculaire, un massage thoracique sera réalisé dans l'une des 5 conditions expérimentales précédemment décrites. Les animaux seront ensuite suivis pendant 30 minutes après la reprise de la circulation spontanée. 8 animaux seront inclus dans chaque groupe pour un total de 40 animaux.

Compte tenu de la complexité de l'affection considérée et du caractère diverse des critères étudiés ici, cette situation ne peut pas être mimée in vitro et il n'existe aucune méthode alternative capable de mimer la physiologie cardiovasculaire au décours d'un arrêt cardiaque. Cette absence de méthodes alternatives traduit donc une absence de Remplacement possible. Afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés, nous avons opté pour un critère simple d'évaluation de l'effet du massage cardiaque. Cette démarche de réduction s'est aussi accompagnée d'un calcul statistique du nombre d'animaux minimum pour pouvoir mettre en évidence un éventuel effet. Enfin, les paramètres mesurés au cours du massage cardiaque sont les plus complets possibles afin de valoriser au mieux la procédure expérimentale en vue d'un raffinement maximal. Pour limiter la souffrance au maximum, le protocole anesthésique inclut une forte valence analgésique assurée par l'administration de morphine. La souffrance et l'angoisse des animaux sera réduite au maximum par le maintien à l'état anesthésié sans réveil.

10348 La régulation des échanges d'eau dans le tissu cérébral est un mécanisme majeur jouant un rôle dans de nombreuses conditions cliniques et pathologiques, comme les œdèmes cytotoxiques et vasogéniques cérébraux, la déshydratation, les accidents vasculaires. Ces mécanismes impliquent des canaux permettant les échanges d'eau entre le milieu extracellulaire et les membranes des cellules gliales et vasculaires. L'ancrage membranaire de ces canaux implique une forme gliale de dystrophine impliquée dans l'apparition de troubles cognitifs sévères dans la myopathie de Duchenne, suggérant qu'ils ont pour origine des altérations glio-vasculaires perturbant l'homéostasie hydrique. Notre projet a pour but d'étudier ces mécanismes chez une souris qui n'exprime pas cette dystrophine, à l'aide d'approches d'imagerie par IRM et des analyses post-mortem des tissus cérébraux, en simulant des conditions cliniques associées à un déséquilibre hydrique, puis en testant des approches de thérapie génique visant à corriger les altérations identifiées. Cette étude préclinique incluant des tests fonctionnels doit être menée sur des souris vivantes, avant d'envisager la poursuite de ce type d'approche thérapeutique et leur entrée en phase d'étude clinique. Une partie des procédures expérimentales et analyses fonctionnelles ont déjà été approuvées par le comité d'éthique. Tout est mis en œuvre pour éviter douleur et stress (anesthésie, analgésie, manipulation) et pour assurer la surveillance de l'état de santé des souris en phase post-opératoire et le respect des points limites, en concertation avec le vétérinaire et la cellule « bien-être animal » de notre institut. Le nombre maximal de souris dans cette étude est de 372 souris. Si certains tests fonctionnels ne s'avèrent pas pertinents pour tester les effets d'un traitement de thérapie génique alors ce nombre peut être réduit jusqu'à un minimum de 204 souris. Des statistiques non paramétriques adaptées aux petits échantillons sont aussi utilisées pour réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés.

10349 Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, couramment appelées MICIs, représentent aujourd'hui un véritable problème de santé publique. Leur cause est de mieux en mieux comprise et de plus en plus d'arguments sont aujourd'hui en faveur du rôle clé des protéases, permettant la dégradation des protéines, dans la survenue de ces maladies.

Dans le cadre de ce projet, notre intérêt s'est porté sur la classe des protéases à sérine (enzymes qui clivent les liaisons peptidiques des protéines) dont l'implication est clairement établie dans le contexte des MICIs. Ces protéases sont quantitativement les plus importantes des protéases secrétées dans l'intestin. Elles sont libérées au cours de la réaction inflammatoire par de nombreux types cellulaires (cellules intestinales, immunitaires, bactéries...) et représentent un acteur pro-inflammatoire à action variée dont l'augmentation de la perméabilité cellulaire et l'expression du facteur de transcription NF-kb.

Le but de ce projet est d'étudier chez un modèle de souris, le potentiel inflammatoire de ces protéases à sérine produites par des bactéries intestinales. En fonction des résultats, de nouvelles

stratégies thérapeutiques ciblant ces molécules pourraient être adoptées pour traiter ces pathologies.

Le modèle de colite induite par le Dextran Sulfate de Sodium (DSS) chez la souris C57BL/6J reproduit un grand nombre des caractéristiques physiopathologiques des maladies inflammatoires de l'intestin 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. Les protéases à sérine seront inoculées par gavage aux souris pendant les 7j d'administration du DSS (1,5%) via l'eau de boisson. Un suivi clinique journalier 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 de souris prélevées après l'euthanasie, ainsi que 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 chez l'hôte, 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 préliminaires in vitro permettront de sélectionner les 10 protéases à sérine les plus actives.

Réduire : Le nombre de souris nécessaire a été défini en se basant sur des études précédentes publiées dans la littérature scientifique, mais aussi grâce à un test de puissance afin d'incorporer un nombre minimum d'animaux tout en gardant la possibilité d'obtenir des résultats statistiques significatifs. Pour cette étude, 5 séries permettant d'étudier l'effet des 10 protéases à sérine sélectionnées seront mises en œuvre. Chaque série comprendra 7 groupes expérimentaux de 10 souris (2 groupes dont l'inflammation légère sera induite au DSS et qui recevront chacun une protéase à sérine via une bactérie productrice, 2 groupes sans inflammation induite au DSS et qui recevront chacun une protéase à sérine via une bactérie productrice, 1 groupe dont l'inflammation sera induite au DSS et qui recevra seulement du milieu de culture, 1 groupe dont l'inflammation sera induite au DSS et qui recevra une bactérie non productrice de protéase, un groupe sans inflammation induite au DSS et sans protéase). Le nombre total d'animaux nécessaires pour cette procédure est de 350 souris.

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. La durée d'administration du DSS sera courte (7 jours) afin de limiter le développement des lésions au strict nécessaire dans le but d'étudier le potentiel pro-inflammatoire des protéases à sérines. 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.

10350 Le cancer est la principale cause de mortalité en Europe et 14.1 millions individus dans le monde sont affecté par cette maladie. Malgré les avancées technologiques dans le diagnostic et le traitement des cancers de nombreux patients succombent à la maladie. Il est donc urgent de développer de nouvelles études afin d'améliorer la prise en charge des patients, ainsi que d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques permettant de développer des traitements efficaces.

Le système immunitaire est au centre de nouvelles approches thérapeutiques afin d'induire une immunité anti-tumorale et donc la destruction des tumeurs. L'efficacité de ces immunothérapies requiert au préalable une inflammation dans le site tumoral. Cette inflammation n'est présente que dans un nombre limité de tumeurs et peut être induite par l'ADN tumoral. Ces observations posent la question fondamentale de savoir ce qui régule cette inflammation dans la majorité des tumeurs. Nous avons découvert une enzyme dont la fonction principale est de dégrader l'ADN libéré par les cellules mourantes empêchant ainsi sa capacité à induire une réponse inflammatoire par le système immunitaire. Cette enzyme est produite par les cellules sentinelles du système immunitaire qui jouent un rôle essentiel dans l'initiation des réponses immunitaires anti-tumorales. Nous proposons

donc dans le cadre de cette demande d'autorisation de projet d'étudier si cette enzyme participe au contrôle de l'inflammation dans les tumeurs et si celle-ci pourrait être une cible thérapeutique afin de restaurer dans la majorité des tumeurs une réponse immunitaire anti-tumorale.

Malgré des approches ex-vivo et in vitro qui seront utilisées pour répondre à certaines questions spécifiques relatives à ce projet, il n'y a pas d'alternative aux modèles murins afin d'étudier le rôle de notre enzyme d'intérêt au cours du développement tumoral in vivo. En effet, nous utiliserons des souris déficientes pour notre enzyme d'intérêt qui seront soit transplantées avec des tumeurs murines soit croisées avec des souris développant de manière spontanée des tumeurs mammaires. Ce dernier modèle murin de développement spontané de tumeurs est utilisé car il est comparable à la pathologie humaine et permettra d'étudier de manière spatiotemporelle les interactions entre le système immunitaire et les tumeurs. L'objectif de cette étude est donc de montrer l'impact de l'absence de notre enzyme sur la progression tumorale et les réponses immunitaires anti-tumorales. De plus, nous analyserons le potentiel thérapeutique de l'inactivation de notre enzyme d'intérêt seule en combinaison avec des immunothérapies et chimiothérapies existantes dans l'induction d'une immunité anti-tumorale durable.

Afin de réaliser l'ensemble de nos expériences, 2190 souris sont demandées sur une période de 3 ans. Dans le respect de la règle des 3R, le nombre d'animaux a été défini d'un point de vue statistique afin de réduire et optimiser leur utilisation. Des méthodologies de culture cellulaire et de modélisation in vitro ont été également implémentées afin de remplacer au possible l'utilisation d'animaux. Finalement, afin de respecter la notion de raffinement, le bien-être de nos animaux sera suivi lors des différentes procédures d'induction de tumorigenèse pour réduire au minimum toute douleur, souffrance, angoisse et tout dommage durable susceptible d'être infligé aux animaux. De plus, les points limites seront fixés notamment basé sur la perte du poids des animaux et des modifications de leur état global (prostration, isolement, pelage hirsute, etc.) afin de stopper l'expérimentation avant une induction de douleur ou souffrance des animaux.

10351 Les sources d'exposition aux faibles concentrations de substances radiologiques ou chimiques sont multiples, d'origine naturelle ou générées par l'activité humaine. Le rein est l'un des principaux organes cibles de la toxicité induite par des substances exogènes du fait de ses fonctions de filtration, transport et réabsorption de substances chimiques. 10 % de la population mondiale est affectée par des pathologies rénales chroniques dont le cancer rénal avec une disparité importante selon les régions. Lors d'expositions chroniques ou répétées, les risques d'atteintes à long terme tel que le cancer rénal peuvent augmenter lorsque ces mécanismes sont dépassés ou après une compensation défectueuse. Le présent projet permettra d'établir au laboratoire une colonie d'animaux transgéniques présentant une prédisposition accrue pour un type de cancer du rein. Des analyses préliminaires de biocinétique de l'uranium seront également réalisées sur ce modèle et sur les souris de phénotype sauvage (Wild Type, WT). Par la suite, un second projet sera présenté pour l'utilisation de ces animaux pour étudier le potentiel carcinogène de l'uranium au niveau rénal en mimant une exposition « professionnelle » (exposition longue durée à faibles concentrations). La conception de ce protocole répond aux exigences de remplacement, de réduction et de raffinement relatives à l'expérimentation animale. Le modèle animal présente une complexité qui ne peut être reproduite in vitro à l'heure actuelle malgré le développement de ces méthodes. L'utilisation d'animaux transgéniques ayant une forte incidence de tumeurs rénales permettra de réduire fortement l'effectif d'animaux nécessaires par rapport à des animaux WT. Dans le contexte du bien-être animal, les animaux seront anesthésiés, prélevés et euthanasiés selon la réglementation en vigueur. Pendant toute la durée des procédures expérimentales, les animaux seront hébergés en groupe, avec un enrichissement supplémentaire (ouates etc...). L'isolement pourra être fait uniquement en cas d'agression entre congénères. Un suivi strict des animaux sera réalisé. Les points d'arrêt définis seront appliqués à tous les animaux de l'étude présentant des signes comportementaux ou cliniques et conduiront à l'euthanasie anticipée de l'animal. Ce projet nécessitera 600 souris.

10352 Les changements prévus par le Groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat (GIEC) en 2014 pour le XXI^e siècle indiquent que l'océan continuera de se réchauffer et de

s'acidifier. En particulier pour les eaux tempérées de l'Atlantique Nord, les changements dans les températures moyennes à la surface de la mer devraient passer de + 1°C pour le scénario le plus optimiste à +4°C pour le plus pessimiste.

La façon dont les communautés marines réagiront à ces variations demeure incertaine, mais dépendra de l'écologie et de la physiologie propres à chaque espèce. Les poissons, en particulier, ont évolué physiologiquement pour pouvoir vivre dans une plage spécifique de variation environnementale, et l'existence à l'extérieur de cette plage peut être stressante ou fatale à l'espèce. Il est donc nécessaire de conduire des recherches sur la physiologie et l'écologie des poissons si nous voulons prédire comment les espèces réagiront aux perturbations et ainsi réduire les incertitudes pour la gestion future des stocks de poissons. La mortalité au cours des premiers stades de vie est une cause majeure des variations naturelles de l'importance des populations de poissons marins, ce qui rend crucial la compréhension des effets des changements climatiques sur les premiers stades de la vie des poissons pour anticiper le devenir des stocks de pêche.

Le hareng de l'Atlantique (*Clupea harengus*) est largement répandu dans tout l'océan Atlantique Nord et, en plus d'être une espèce importante sur le plan commercial, il représente également une importante source de nourriture pour un certain nombre d'autres espèces.

L'objectif de ce projet sera d'étudier les réponses des larves de hareng aux changements globaux (paramètres multiples et variables). Nous utiliserons 10800 larves. Comme nous visons à réaliser une évaluation réaliste des impacts du changement global sur les larves de poissons nous testerons différents scénarios qui représentent une approche plus intégrative en tenant compte du fait que de nombreux facteurs changent simultanément. Les paramètres de réponse d'intérêt incluront la survie, la croissance, l'alimentation et les indicateurs de condition physiologique (acides gras essentiels, ARN/ADN, enzymatique, histologie). L'information issue de ce projet nous aidera à comprendre l'impact potentiel du changement global sur la condition physiologique des larves de poissons, leur survie et leur potentiel succès de recrutement. Ces résultats généreront les connaissances nécessaires pour gérer efficacement et exploiter durablement les systèmes côtiers. Ce projet répond aux critères des 3R :

Remplacement : Dans le cadre d'une étude visant à comprendre les réponses de larves poissons à des changements environnementaux, il n'est pas possible de faire appel à des méthodes de remplacement. En effet, ces réponses sous-tendent différents processus développementaux et biologiques ce qui nécessite l'utilisation d'organismes vivants afin d'intégrer dans l'étude toutes les composantes physiologiques.

Réduction : le nombre de larves a été réduit au minimum et défini au seuil de la pertinence scientifique et statistique.

Raffinement : Les mesures de raffinement viseront à assurer des conditions optimales d'hébergement des animaux (volume d'eau adapté avec renouvellement en continu, oxygénation suffisante, rythme jour/nuit naturel, présence de suffisamment de congénères pour exprimer un répertoire comportemental riche). Ces conditions d'élevage seront assorties de soins quotidiens, avec un suivi plusieurs fois par jour: les principaux paramètres de l'expérience (température, pH, oxygénation, alimentation) seront relevés tous les jours et inscrits dans une feuille de suivi.

10353 L'obésité est un problème majeur de santé publique à l'échelle mondiale. Actuellement, plus de 300 millions de personnes sont obèses et ce nombre ne cesse de s'accroître. Ces patients ont un risque accru de développer des pathologies chroniques telles que le diabète de type 2, les maladies cardiovasculaires et plusieurs types de cancers. Soigner l'obésité permettrait de réduire de manière significative l'incidence de toutes ces maladies associées. Malheureusement, les traitements existants à l'heure actuelle sont peu efficaces et les régimes hypocaloriques ne conduisent qu'à une perte de poids temporaire, suivie très fréquemment par un retour rapide au poids initial dès la fin du régime.

Une accumulation croissante des connaissances supporte que la signalisation des récepteurs β_2 adrénérgique au niveau des macrophages est modulée dans plusieurs pathologies. Cependant son implication dans l'étiologie de l'obésité n'est que très peu connue. Notre projet vise à étudier le rôle des récepteurs β_2 adrénérgiques présent au niveau des macrophages, en les invalidant spécifiquement au niveau de cette population.

Pour ce faire, nous étudierons un modèle de souris génétiquement modifiées où le récepteur $\beta 2$ adrénergique sera enlevé de la lignée myéloïde, lignée à l'origine des macrophages, rendant alors impossible ce type de communication dans ces cellules. Ces souris seront comparées à d'autres souris chez qui la protéine sera toujours présente et dont la communication sera inaltérée. Les conséquences de l'absence de cette protéine seront évaluées d'un point de vue métabolique (consommation de nourriture et d'eau, dépense énergétique et activité locomotrice, composition corporelle), en condition standard, à thermo-neutralité, après une exposition au froid et une période de jeûne/re-nutrition.

Nous utiliserons un maximum de 48 souris adultes (âgées d'au moins 8 semaines) sur une période de 2 ans. La souris est un modèle de choix car la physiologie générale est suffisamment proche de celle de l'être humain. De plus, la possibilité de manipuler les gènes de la souris, dans notre cas en inactivant les récepteurs $\beta 2$ adrénergiques présent au niveau des macrophages, en fait l'animal de laboratoire de choix. Dans ce projet de physiologie intégrée, nous étudions des phénomènes impliquant une communication bidirectionnelle entre le cerveau et le reste de l'organisme, que ce soit pour la régulation de l'appétit, de la glycémie ou encore le stockage de graisse. Il n'existe à ce jour aucune méthode alternative ou substitutive permettant un remplacement in vitro ou in silico. Nous avons néanmoins optimisé les protocoles afin de réduire au maximum le nombre de souris utilisées : des tests de puissance statistique ont été employés pour calculer le plus petit nombre d'animaux nécessaire à l'obtention de résultats statistiquement exploitables. Enfin, dans un souci de raffinement des procédures, un soin particulier est apporté aux questions relatives au bien-être animal. L'évaluation des paramètres métaboliques nécessite un isolement de l'animal. Les souris sont hébergées en cages individuelles dans un système dédié mimant au maximum les conditions habituelles d'hébergement, système dit « home cage », avec régulation de la température, de l'humidité et de la luminosité. Le manque d'interactions sociales est compensé par un enrichissement des cages (carré de cellulose, bâtonnets en bois). Avant les expériences et pour réduire au maximum le stress des animaux, ces derniers sont manipulés en utilisant un tunnel en carton présent dans la cage.

Les informations apportées par ce projet nous permettront d'accroître nos connaissances sur la régulation du poids corporel et seront cruciales pour déterminer si les récepteurs $\beta 2$ adrénergiques présent au niveau des macrophages représentent une cible thérapeutique intéressante pour le développement de nouveaux médicaments.

10354 Le tourteau de soja est une matière première incontournable pour l'alimentation des poulets de chair. En effet, son profil nutritionnel et son prix attractif justifient son incorporation jusqu' à 25 % dans certaines formules. Néanmoins, majoritairement importé, le tourteau de soja concentre de nombreuses controverses : déforestation, organismes génétiquement modifiés, dépendance aux importations et à la volatilité des prix.

Afin de proposer des aliments utilisant des matières premières locales (françaises) tout en maintenant le profil nutritionnel des formules, la substitution du tourteau de soja fait intervenir des tourteaux de tournesol et de colza ainsi que des graines de protéagineux (ici lupin). Les aliments obtenus sont plus complexes et souvent plus riches en fibres. Or, la nature et la quantité des fibres sont susceptibles d'interférer dans la valorisation des nutriments (protéines, phosphore.) ou encore l'intégrité digestive et peuvent également modifier l'humidité des fientes. Cet essai a donc pour objectif d'évaluer de façon globale différents programmes alimentaires "autonomes en protéines françaises" en termes d'effets sur les performances zootechniques, l'état de la litière et bien-être des animaux, la santé des animaux, les rejets environnementaux et la qualité des produits.

L'essai permettra d'évaluer 6 programmes alimentaires différents. 1200 Gallus chair, mâles et femelles, à croissance rapide seront élevés au sol pendant 37 jours. Ils seront répartis entre 48 parquets de 25 animaux. Les 6 programmes alimentaires utilisant différentes associations de matières premières, seront formulés de façon à couvrir l'ensemble des besoins nutritionnels des animaux au cours des différentes périodes d'élevage (démarrage, croissance, finition). Au cours de l'élevage, les mesures de performances zootechniques feront intervenir des pesées d'animaux, le bien-être sera évalué à travers une notation de l'état des pattes. Sur les 1200 animaux mis en place seulement 96 subiront la procédure expérimentale de prise de sang, dans le cadre du suivi de la

santé. La qualité des produits sera mesurée après euthanasie sur 240 animaux (différents des 96 concernés par la procédure expérimentale).

Le protocole respecte le principe des 3R :

- remplacement : Les interactions entre matières premières sont aujourd'hui mal connues et ne peuvent donc être modélisées. Les effets des fibres sont multiples et complexes et le manque de données ne permet pas de les prédire, d'autant plus dans le cadre d'une évaluation globale dans des conditions d'élevage proches du terrain. Compte tenu de l'objectif de l'essai, le modèle animal ne peut être substitué.

- réduction : Le nombre d'animaux a été réduit de façon à pouvoir mettre évidence une différence significative entre traitements en tenant compte de la variabilité sur les critères indice de consommation et rejets entre autres. Le nombre de prélèvements de sang a été réduit à son minimum en tenant compte de la puissance permettant de montrer une différence significative et pertinente d'un point de vue biologique sur le critère charge bactérienne sanguine.

- raffinement : Les animaux seront hébergés au sol en groupes de 25 (densité inférieure au maximum autorisé) pendant toute la durée de l'essai afin d'observer des interactions sociales entre les poulets. Des enrichissements appropriés du milieu de vie seront mis en place : des boules colorées puis des blocs à piquer seront mis à disposition respectivement des jeunes animaux et des animaux plus âgés pour favoriser le comportement exploratoire. Les animaux seront visités au moins une fois par jour.

10355 Des mutations dans le gène de la dynéine cytoplasmique (que nous appellerons dynéine dans la suite de la saisine) ont été associées à des maladies du motoneurone (MND, Motor Neuron Disease) et notamment à la Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA). Deux mécanismes impliqués dans la SLA pourraient être mécaniquement associés : la formation d'agrégats et un déficit de transport axonal. La dynéine est la protéine motrice responsable du trafic rétrograde sur les microtubules. Elle amène notamment les protéines mal repliées aux systèmes de dégradation dépendants des lysosomes et des protéasomes. Ainsi, son dysfonctionnement pourrait favoriser l'agrégation anormale des protéines. Par ailleurs, l'âge diminue le bon fonctionnement de la dynéine, et représente le facteur de risque le plus important de la SLA. Nous faisons ici l'hypothèse que la réduction de la fonction de la dynéine, causée par l'âge et/ou par d'autres événements cellulaires, favorise l'agrégation et la séquestration pathologique de protéines. Pour tester cette hypothèse, nous proposons d'altérer génétiquement le niveau d'expression de la dynéine dans les MN chez des souris sauvages mais aussi chez des souris exprimant la protéine FUS mutée, connue pour s'agréger dans certains cas de SLA. Nous allons utiliser des nouveaux modèles de souris transgéniques exprimant différents niveaux de dynéine dans les motoneurones en présence ou en absence de la mutation FUS. Etant donné les mécanismes étudiés ainsi que leur intégration dans des systèmes anatomiques complexes, il n'est pas possible de remplacer le modèle murin par des modèles *in silico* ou *in vitro*. Les techniques que nous utiliserons pour avancer dans ce projet sont déjà mises au point et utilisées de manière courante dans notre laboratoire. Elles sont donc raffinées. Dans le respect de l'approche des 3 R, nous avons réduit le nombre de souris que nous utiliserons à un total de 321 souris. Pour limiter l'anxiété et améliorer le bien-être de l'animal, les manipulations réalisées sur les souris seront douces, calmes et fréquentes. Les animaux seront observés quotidiennement et des points limites sont définies. Pour limiter le stress social lié à la surpopulation mais sans pour autant laisser les animaux isolés (seul par cage), nous avons décidé de placer les animaux en groupe de 3 ou 4 par cage. Le milieu sera également enrichi par l'introduction de papier, de coton ou encore de bâtons dans la cage.

10356 Notre équipe de recherche s'intéresse aux régulations post-transcriptionnelles de l'expression génétique au cours du développement des vertébrés. Nous utilisons comme modèle d'étude *Xenopus Tropicalis* et *Xenopus Laevis* qui sont deux espèces d'amphibien. Les femelles sont capables de pondre plusieurs centaines d'œufs après stimulation hormonale, ces œufs après fécondation présentent un développement externe qui est bien caractérisé et qu'il est facile de suivre sous loupe binoculaire.

Les femelles sexuellement matures sont stimulées par l'injection d'hormones tous les 2 à 3 mois et sont gardées de façon pérenne car elles produisent des œufs de façon continue tout au long de leur vie. Les mâles sont eux euthanasiés dès que l'on réalise la fécondation in vitro.

Afin de déterminer le rôle de gènes d'intérêt dans le développement de l'œil, nous injectons dans les embryons fécondés des molécules qui bloquent ou modifient leur expression (Morpholinos ou ARNguides) et nous analysons les conséquences développementales de cette injection. Le développement des larves est stoppé avant que celles-ci ne se nourrissent pour la majorité des gènes ciblés (stade 44, 4 jours à 22°C), stade pour lequel un phénotype est déjà observable. Ces larves ne rentrent donc pas dans le calcul du nombre d'animaux utilisés à des fins expérimentales puisqu'elles ne sont pas autonomes. Pour une dizaine de gènes candidats, nous envisageons de pousser le développement des larves jusqu'au stade 48 (8 à 10 jours à 22°C), stade pour lequel le développement de l'œil est complet. Pour chaque gène testé il faut compter l'analyse de 600 larves. Le projet de recherche présenté ici nécessite sur une période de 5 ans l'utilisation d'environ 175 femelles (*X. laevis* et *X. tropicalis*) et 6000 larves élevées jusqu'au stade 48.

La règle des 3R (Remplacement/Réduction/Raffinement) est appliquée en :

Remplacement :

Notre objectif est de déterminer le rôle de gènes d'intérêt dans l'organogenèse, ces processus complexes ne peuvent être reproduits en leur globalité en culture cellulaire.

Nous ne pouvons donc remplacer l'utilisation de ce modèle animal.

Réduction :

a) Mutualisation de l'utilisation des mâles 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 mâle.

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.

Les femelles piquées sont isolées en bacs individuel lors de cette période qui s'étend au maximum sur 48 heures.

10357 Chez l'Homme, l'hypoactivité détrusorienne (HD) a été définie par l'International Continence Society comme une diminution de la force et/ou de la durée de la contraction détrusorienne résultant en une vidange vésicale prolongée et/ou en une incapacité à vider la vessie complètement en un temps normal.

La prévalence de l'HD oscillerait entre 8 % et 48 % selon la définition utilisée et l'âge de la population étudiée. En effet, l'incidence de l'HD augmente avec l'âge et les facteurs de comorbidités associés qui contribuent à cette pathologie. Les principaux critères diagnostiques indicateurs d'HD utilisés dans les études, sont des paramètres découlant d'une évaluation urodynamique de la vessie des patients par cystométrie. Ainsi ont été majoritairement rapportés : une diminution du débit, une réduction de la pression du détrusor au débit maximal et un volume urinaire résiduel post-mictionnel élevé. Les mécanismes qui sous-tendent cette pathologie restent mal connus et peuvent être secondaires à de nombreux facteurs étiopathogéniques. Ces derniers modulent les caractéristiques évolutives et l'expression clinique de l'HD tels que des lésions neurogéniques (par dégradation des mécanismes d'innervation efférente et afférente de la vessie), des perturbations myogènes (modifications ultrastructurales du détrusor) ou des causes idiopathiques.

Les traitements pharmacologiques courants de l'HD sont les antagonistes des récepteurs α -adrénergiques, les agonistes des récepteurs muscariniques (béthanéchol) et les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (distigmine). Cependant, l'analyse de ces traitements a démontré une

efficacité limitée et des effets secondaires responsables d'une observance médiocre. L'auto-sondage reste le traitement de choix de la rétention urinaire.

En raison de l'étiologie inconnue de la pathologie, aucune étude épidémiologique réelle n'a encore été réalisée. Il est donc nécessaire de conduire une recherche visant tout d'abord à développer et optimiser un modèle animal reproduisant les signes cliniques de cette pathologie pour ensuite permettre la réalisation de tests précliniques sur ce modèle visant à reverser le phénotype pathologique induit.

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, le modèle préclinique le plus pertinent qui présente des caractéristiques similaires à celles observées dans la pathologie humaine est le rat ayant subi une sténose du canal lombaire (LCS pour Lumbar Canal Stenosis) au niveau de la queue de cheval. Les études précliniques menées sur ce modèle conduiront à l'utilisation de 960 rates 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. Un suivi quotidien de l'état général et du poids des animaux est réalisé, pour une action rapide en cas d'état de souffrance de l'animal. De plus, ces animaux présentent un trouble mictionnel qui nécessite un change adapté : augmentation de la fréquence, augmentation de la quantité de litière (raffinement).

10358 Le but du programme est de mesurer la consommation et les comportements alimentaires des trois populations de canard (Barbarie, Pékin, mulard) intervenant dans la production de foie gras, afin d'évaluer la faisabilité d'une sélection de canards répondant mieux au gavage.

Contexte : En France, le foie gras est produit à 95% à partir de canard mulard mâle. Il s'agit d'un canard hybride, issu du croisement entre une cane de race Pékin et un canard de Barbarie. Le mulard est un animal stérile. Par conséquent les programmes de sélection visant à améliorer la quantité et la qualité du foie gras portent sur les deux populations parentales. En pratique, la sélection repose sur le testage sur descendance pour estimer l'aptitude des Barbaries et des Pékins à produire des mulards performants en quantité et qualité des foies gras. C'est un processus long et d'efficacité modérée. Des critères pertinents mesurés directement sur les animaux candidats à la sélection permettraient une sélection plus efficace. Par ailleurs, comme pour de nombreux animaux de production, l'alimentation représente les deux tiers du coût de production d'un canard gras. Ainsi, l'amélioration de l'efficacité alimentaire (capacité à valoriser l'aliment) est un des enjeux majeurs de la sélection, pour lequel une mesure précise de la consommation est requise. Comme souvent en recherche, la mise au point d'appareils de mesure de la consommation individuelle a permis de lever un verrou mais a également mis en évidence une variabilité des comportements alimentaires, et ouvert la voie vers d'autres investigations.

Objectifs : Nous souhaitons, par ce programme, investiguer la faisabilité d'une sélection pour le foie gras basée sur des nouvelles données de comportement alimentaire. On entend par comportements alimentaires l'ensemble de caractères descriptifs tels que le nombre et la durée des repas, la vitesse d'ingestion ou encore le temps consacré à l'alimentation. Pour cela nous utilisons des mangeoires électroniques qui enregistrent chaque visite, pèsent l'animal et calculent la consommation d'aliment. Ces prototypes, validés sur les trois populations de canard d'intérêt, permettent la mesure de la consommation sur des animaux élevés au sol en groupe qui peuvent interagir entre eux. Ils se substituent ici aux cages individuelles autrefois utilisées pour mesurer la consommation, tout en permettant aux animaux d'exprimer les comportements sociaux observés sur le terrain (principe de raffinement). Les trois populations intervenant dans la production de foie gras (mulard, Barbarie et Pékin) seront mesurées.

Trois procédures expérimentales seront mises en œuvre au cours du projet :

1. La mesure TOBEC (conductivité électromagnétique corporelle) de l'état d'engraissement des animaux. Dans le cas du canard gras, un indicateur de l'état d'adiposité est indispensable pour corriger la consommation brute et estimer de façon appropriée l'efficacité alimentaire des animaux. Pour cela l'animal subit une contention douce dans une chambre de mesure pendant une période

maximale de 5 minutes par un personnel formé, et la mesure (non invasive) n'est effectuée que quand l'animal s'est calmé.

2. Une prise de sang visant à caractériser le métabolisme avant gavage des animaux produisant du foie gras.

3. La mise en cages individuelles des reproducteurs (40 mâles et 80 femelles dans les deux lignées parentales, avec une marge de sécurité pour obtenir ce nombre de reproducteurs utilisables avec la plus large représentation familiale disponible).

Dispositif animal : Par la simulation *in silico* du fonctionnement des populations concernées, nous avons déterminé quels effectifs mettre en place. Nous nous sommes attachés à garantir la qualité statistique des paramètres estimés (biais minimal, précision maximale) avec le moins d'animaux possible (principe de réduction). Nous mesurerons donc 2 cohortes successives (parents et descendants) dans chaque population parentale et 2 cohortes de descendants mulards, pour estimer au mieux la variabilité observée qui est liée à la génétique. Soit 6 cohortes de 240 animaux chacune. Le nombre total d'animaux mesurés sera donc de 1440 animaux, auxquels s'ajoutent 2 cohortes de femelles Barbarie qui ne subiront aucune des mesures décrites. Elles seront simplement conduites en cages individuelles comme des futures reproductrices. L'effectif total est donc de 1760.

Nous disposons de 2 salles, chacune équipée de 6 mangeoires électroniques. Les animaux y sont répartis avec une densité inférieure aux normes d'élevage. Dès le premier jour les canetons sont habitués au dispositif et à s'alimenter dans la mangeoire, au départ non fonctionnelle.

Le protocole diffère selon les lots d'animaux considérés (2 lots par population) :

- Lots de canards de Barbarie : 240 mâles sont mesurés pour la consommation jusqu'à 9 semaine et passés au TOBEC. 80 animaux (2 fils/père) sont conservés comme potentiels futurs reproducteurs. 18 animaux seront euthanasiés pour établir la prédiction du TOBEC et 142 animaux seront conduits en gavage classique en cages collectives avant abattage et découpe des carcasses pour mesures quantitatives et qualitatives.

- Lots de mulards : 240 mâles sont mesurés pour la consommation jusqu'à 9 semaine et passés au TOBEC. 32 animaux seront euthanasiés pour établir la prédiction du TOBEC, et 208 animaux seront conduits en gavage classique en cages collectives avant abattage et découpe des carcasses pour mesures quantitatives et qualitatives.

- Lots de Pékins : 240 animaux des deux sexes seront mesurés pour la consommation durant 7 semaines et passés au TOBEC. 25 animaux seront euthanasiés pour établir la prédiction du TOBEC et 215 animaux seront conduits comme des futurs reproducteurs potentiels.

Respect des 3 R's :

- La réduction des effectifs a été réfléchiée après une modélisation *in silico* du schéma de sélection envisagé.

- Le remplacement n'est pas possible. Il n'existe pas de modèle biologique alternatif permettant de prédire la production de foie gras

- Le raffinement se manifeste ici dans la mesure au sol et en groupe de la consommation d'aliments, préférée à une mesure en cage individuelle. De plus, une observation journalière des animaux sera réalisée tout au long de l'élevage et du gavage (le cas échéant), afin de s'assurer quotidiennement du bon état de chaque animal.

10359 La peste est une maladie considérée comme ré-émergente par l'OMS. Des souches de *Y. pestis* résistantes à ces antibiotiques ont été isolées. De nouveaux antibiotiques tels que les inhibiteurs de l'enzyme LpxC sont actuellement en développement. *In vitro*, nous avons observé que les anti-LpxC étaient actifs vis-à-vis de *Y. pestis*, stables dans les microsomes hépatiques et dépourvus de toxicité cellulaire. L'expérience montre que la proportion d'antibiotiques actifs *in vitro* et qui le restent *in vivo* est inférieure à 2%. C'est pourquoi, il est admis par la communauté scientifique d'utiliser des modèles rongeurs pour étudier le profil toxicologique complet, la pharmacocinétique et le potentiel antibactérien des antibiotiques avant d'envisager les 1ères administrations à l'homme. L'objectif de notre projet consiste à étudier l'efficacité des anti-LpxC, *in vivo*, chez la souris OF1 infectée par une souche de *Y. pestis* sensible ou par une souche multirésistante aux antibiotiques usuels, dans un modèle murin de peste et, d'évaluer si l'acquisition des mécanismes de résistance aux antibiotiques

induit un coût biologique se traduisant par une modification de la virulence et de la capacité de dissémination dans l'organisme de *Y. pestis*. Concernant l'évaluation de l'efficacité des inhibiteurs de LpxC, la dose protectrice 50 et protectrice maximale, les paramètres pharmacocinétiques des anti-LpxC, et leurs effets bactériostatiques et/ou bactéricides dans un modèle murin de peste bubonique et pulmonaire seront déterminés sur des groupes de 5 à 12 souris. Au total, 5 molécules devraient être testées. Concernant l'étude du coût biologique de la multirésistance de *Y. pestis*, nous déterminerons la DL50 de la souche multirésistante sur des groupes de 12 souris et sa compétitivité par rapport à la souche sauvage sensible aux antibiotiques sera appréciée par des expériences de co-inoculation avec la souche sauvage sensible sur des lots de 8 souris. Au maximum, 592 souris par molécule d'anti-LpxC testée seront utilisées dans l'hypothèse où la molécule n'est pas toxique et a des paramètres pharmacocinétiques satisfaisants soit un maximum de 2960 souris. Le nombre d'animaux par groupe ne peut être < 5 afin de ne pas compromettre la puissance des tests statistiques. Les animaux seront manipulés individuellement à l'isolement afin d'éviter tout stress aux animaux non manipulés. L'ensemble des expériences impliquant la manipulation de *Yersinia pestis* seront réalisées en confinement A3. Après l'infection, les animaux seront observés quotidiennement pendant toute la durée d'expérimentation. Tout animal sera euthanasié (dislocation cervicale) en cas de signes terminaux de la maladie. Il est à noter que la peste est une maladie dont les symptômes apparaissent brutalement et il n'est pas rare qu'un animal qui ne présente aucun signe clinique évident succombe à la maladie dans les 12 heures suivant la dernière observation. Comme nous suivons l'effet d'un traitement antibiotique sur un processus infectieux, les médications analgésiques et anti-inflammatoires ne pourront pas être utilisées car elles interfèrent avec ce processus.

10360 La cachexie cancéreuse correspond à un affaiblissement profond de l'organisme lié à une dénutrition importante sous l'effet de substances sécrétées par la tumeur. Il s'agit d'un état très fréquemment retrouvé chez les patients cancéreux et il s'agit d'un facteur important de la haute mortalité des maladies cancéreuses. Cependant, malgré la forte prévalence de la cachexie chez le patient cancéreux (70-80% dans les phases avancées du cancer), l'armada thérapeutique actuelle pour lutter contre ce symptôme s'avère extrêmement pauvre. Il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement établi pour la cachexie.

L'étude décrite dans le présent dossier sera réalisée par une entreprise privée dans le cadre du développement d'un composé X (nature et dénomination confidentielles) destiné à l'amélioration de l'état de cachexie liée au cancer.

L'objectif de la présente étude sera d'évaluer l'impact d'un traitement de 15 jours par un composé X chez un modèle de cachexie mis en place chez la souris via l'inoculation de cellules Lewis Lung Carcinoma (LLC) au niveau sous-cutané.

Pour cette étude, un total de 120 souris C57BL/6 sera utilisé, divisé en 6 groupes expérimentaux :

- Groupe LLC/Véhicule (n=20 ; contrôle négatif du traitement)
- Groupe LLC/Composé X Dose 1 (n=20)
- Groupe LLC/Composé X Dose 2 (n=20)
- Groupe LLC/Composé X Dose 3 (n=20)
- Groupe LLC/Composé de référence (n=20 ; contrôle positif du traitement)
- Groupe Heated-LLC/Véhicule (n=20; contrôle négatif du modèle)

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. Il s'agit d'un modèle de cachexie chez la souris induit par une inoculation de cellules LLC. 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 et un enrichissement du milieu sera assuré par l'ajout de petites maisons dôme (mouse house). Afin de réduire toute douleur au cours des procédures expérimentales, l'inoculation des cellules LLC sera réalisée sous anesthésie gazeuse (les animaux seront placés sur tapis chauffant) et les administrations orales seront réalisées à l'aide de canules de gavage souples pourvues d'un embout en silicone. Enfin, compte-tenu du développement d'une tumeur et d'un état de cachexie

progressif chez les animaux, un suivi journalier particulièrement étroit des animaux à l'aide d'une grille de score de souffrance permettra une action rapide en cas d'atteinte des points limites établis.

- Réduction : Le nombre d'animaux utilisés par groupe a été défini comme le nombre minimum nécessaire pour être en mesure de mettre en évidence une différence statistiquement significative sur les paramètres étudiés.

- Remplacement : 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'efficacité réelle d'un composé sur l'état de cachexie.

10361 Lorsqu'une cellule vieillit, ou est soumise à certains stress, elle peut s'engager sur la voie de la sénescence. Il s'agit d'une voie qui conduit au « gel » de la cellule, lui permettant de rester active mais avec des fonctions très limitées. La cellule sénescence, qui se caractérise notamment par l'expression de la protéine p16, continue cependant à influencer son environnement en sécrétant certains facteurs. Elle peut donc altérer certains mécanismes biologiques normaux ou pathologiques.

La sénescence semble ainsi jouer un rôle important dès l'embryogenèse, et pourrait également favoriser de nombreuses pathologies liées à l'âge comme l'athérosclérose, la prise de poids ou le diabète. Malgré tout, la sénescence et le rôle de la protéine p16 reste très mal connue.

L'objectif de ce projet est de caractériser la sénescence dans des conditions normales (sans pathologie induite) en identifiant ses effets sur l'organisme et l'implication de la protéine p16. Nous nous intéresserons à l'organisme entier avant d'étudier plus spécifiquement certains tissus en nous basant sur des résultats préliminaires. Nous chercherons également à préciser les voies ou processus biologiques directement impactés par la sénescence. Ce projet de recherche fondamental, permettra d'aider à la compréhension et prise en charge de pathologies liées au vieillissement cellulaires au sens large.

Ce projet repose sur le recours à des modèles animaux murins. Nous utiliserons deux modèles transgéniques murins permettant de cibler spécifiquement les cellules exprimant la protéine p16 (notées p16+).

Dans le premier modèle, nommé « p16 /rapporteur », l'expression d'un rapporteur, c'est-à-dire d'un marqueur permettant de rendre la cellule fluorescente par exemple, sera corrélé avec la production de la protéine p16. Nous pourrions ainsi localiser les cellules sénescence exprimant p16.

Le second modèle « p16 /DTA » est un modèle d'ablation cellulaire. Il permettra de tuer les cellules sénescence en corrélant la production de la protéine p16 avec celle d'une protéine tueuse nommée DTA. Ce modèle permettra d'étudier les effets sur le vieillissement de l'absence de ces cellules.

Ces deux modèles (Modèle 1 « localisation », Modèle 2 « ablation ») seront utilisés en parallèle lors d'une étude de vieillissement.

Il s'agit de laisser vieillir nos animaux afin d'observer les effets du temps sur les cellules p16+ et les phénomènes de sénescence. Les animaux seront gardés en vieillissement en animalerie, et euthanasiés aux timelines approximatives de 6 mois, 1 an, 2 ans, 2 ans et plus. En dehors de ces timelines, les animaux pourront être intégrés à l'étude si leur décès a pu être anticipé par euthanasie (pour atteinte d'un point limite). Les animaux bénéficieront d'une attention particulière au niveau de la surveillance compte tenu de la composante de vieillissement. En cas de détection d'une anomalie, une fiche de score sera ouverte et permettra de suivre la rémission de l'animal, de prévoir des soins adaptés, ou d'envisager l'euthanasie si un point limite est atteint.

Prise en compte des 3R :

La sénescence étant un processus intégré impliquant une communication intra- et inter- cellulaire et tissulaire, ce projet nécessite une étude à l'échelle de l'organisme entier. Pour ce projet reposant en partie sur une étude de vieillissement le recours à l'animal reste indispensable et aucune solution de remplacement n'a pu être envisagée. Les protocoles et expérimentations seront conduits dans le respect des exigences de la directive Européenne 2010/63/UE et les 6 arrêtés qui permettent son application en France. Enfin ce projet est soumis à l'accord des autorités compétentes via une revue par le Comité d'Éthique approprié.

Pour ce projet qui se propose d'étudier et caractériser un phénomène sur lequel nous disposons de peu de connaissance, nous envisagerons des comparaisons qualitatives et quantitatives et donc

des tests statistiques non paramétriques et paramétriques. En se basant sur la littérature déjà existante et en prenant en compte les exigences de réduction, nous constituerons des groupes expérimentaux composés au maximum de 10 animaux. Pour cette étude de vieillissement, nous aurons besoin de 200 souris maximum sur 5 ans.

Le raffinement sera assuré à travers : un suivi quotidien par un personnel qualifié, des conditions d'hébergements satisfaisant les besoins de l'espèce, l'enrichissement du milieu, la conservation d'une cohésion sociale durant la durée de vie de l'animal, la détermination de points limites adaptés permettant d'anticiper douleur ou souffrance de l'animal.

10362 Le cancer de la prostate (CaP) est le plus fréquent des cancers masculins en France. C'est une pathologie complexe dont les facteurs pronostiques actuellement disponibles ne permettent pas de prédire avec précision l'évolution de ce cancer vers la résistance aux traitements. Par ailleurs, malgré l'émergence de plusieurs médicaments, ceux-ci restent des traitements palliatifs et non curatifs. Les objectifs de notre équipe sont donc : 1. La recherche de nouveaux marqueurs moléculaires pour prédire l'évolution de la maladie et la réponse aux traitements. Nous étudions, la Neuropiline-1 (NRP1), une molécule impliquée dans les processus de développement et de l'agressivité tumorale qui pourrait être une cible des traitements du CaP. 2. Le développement de nouveaux médicaments qui ciblent plus spécifiquement les cellules tumorales et apportent un bénéfice clinique significatif aux patients. C'est le cas des dermaseptines (DRS), peptides antimicrobiens isolés des sécrétions de peau d'une grenouille amazonienne. Nous avons montré que la DRS-B2, en plus de son activité antimicrobienne, possède une activité anticancéreuse. Cependant, dans le but d'améliorer les effets de cette molécule et afin d'augmenter sa concentration locale et son efficacité tout en diminuant sa toxicité périphérique, nous souhaitons développer une chimiothérapie ciblée (DRS-B2-X). Cette molécule chimérique (DRS-B2-X) interagit spécifiquement avec le récepteur surexprimé à la surface des cellules tumorales prostatique et absent sur les cellules normales. Les résultats in vitro montrent que cette molécule a un effet toxique sur les cellules tumorales et pas sur les cellules normales. En vue de l'utilisation potentielle en clinique, l'évaluation de la DRS-B2-X dans un modèle de développement tumorale in vivo chez la souris est indispensable. Ces expériences seront menées dans le respect des règles des 3R. En effet, le nombre de souris par groupe est réduit à la limite de l'analyse statistique acceptable. Seules les expériences indispensables seront réalisées. Le modèle animal est choisi avec soin. L'expérience est planifiée et organisée afin d'éviter tout stress pour l'animal comme l'utilisation de tapis chauffant et une chambre de réveil thermostatée et oxygénée. Une observation sera effectuée quotidiennement. Si des symptômes de douleurs sont observés, les animaux seront traités avec une analgésie et nous ferons appel au vétérinaire du site pour préciser le problème chez l'animal. Nous utiliserons 200 souris pour réaliser les expériences décrites ci-dessus.

10363 Le cancer du foie constitue la deuxième cause mondiale de morts liées au cancer. Le carcinome hépatocellulaire (CHC) en constitue la forme primitive la plus fréquente avec environ 500 000 nouveaux cas/an. Il survient sur des foies malades, touchés par des hépatites virales ou toxiques (alcool) ou des foies gras à cause de maladies métaboliques (obésité en particulier). Le pronostic du CHC reste très sombre avec un taux de survie à cinq ans n'excédant pas 20%. La chirurgie est le principal traitement curatif mais seule une minorité de patients peut en bénéficier et le traitement palliatif du CHC non opérable n'a qu'une efficacité très modérée avec seulement quelques mois de survie supplémentaire.

Il paraît donc essentiel de décrypter les mécanismes moléculaires impliqués afin de trouver de nouvelles pistes thérapeutiques. Nous travaillons sur la mutation génétique la plus fréquente dans le CHC humain qui conduit à l'activation d'un oncogène, mutation que nous avons reproduite par un modèle murin transgénique. Des études antérieures ont pu identifier 6 gènes impliqués dans le processus tumoral. Pour estimer leur implication dans la survenue et la progression des CHC, notre stratégie sera de les invalider.

Pour respecter la règle des 3R, les procédures expérimentales ont été réfléchies afin de minimiser le nombre d'animaux utilisés tout en permettant une analyse statistique valable. Nous prévoyons l'utilisation de 1045 animaux sur 5 ans pour mener à bien ce projet.

Notre projet s'appuie sur des résultats in vitro, il n'existe pas de technique permettant de remplacer l'expérimentation animale pour étudier le développement tumoral qui est le résultat d'interactions complexes entre la tumeur, son tissu d'origine et son environnement.

Pour les invalidations géniques, nous utiliserons une technique innovante et validée qui évite la création de lignées et les nombreux croisements permettant leur maintien, permettant de réduire le nombre d'animaux utilisés aux seuls animaux nécessaires à l'expérimentation.

Les protocoles d'induction de tumeur hépatique que nous utilisons sont soit génétiques, soit chimiques, soit métaboliques, mais n'entraînent pas de souffrance. Ces protocoles ont lieu dans un autre établissement utilisateur situé sur le même site.

Nous suivrons ici le développement des tumeurs par échographie. Cette technique non invasive permet un suivi longitudinal en évitant les souffrances engendrées par un développement tumoral important puisque les études sont réalisées à des stades précoces, sur de petites tumeurs. Afin d'affiner la surveillance des animaux en surveillant les éventuels effets délétères de l'altération générée sur le foie, des biopsies hépatiques sont prévues dès l'apparition des tumeurs. Il s'agit de réaliser une chirurgie légère, sous anesthésie générale et avec administration d'antalgiques, pour réduire au maximum la douleur.

Les injections et les prélèvements sanguins seront également réalisés sous anesthésie générale. En conclusion, notre hypothèse est que les 6 gènes que nous souhaitons inactiver dans le foie normal ou cancéreux ont une importance majeure dans la cancérisation du foie. Ils pourraient donc être la source de pistes thérapeutiques. La mise en œuvre de notre projet permettra de répondre à cette question, rendue cruciale par le fait que le CHC manque cruellement d'options thérapeutiques à ce jour.

10364 Notre objectif est de démontrer que notre thérapie "Pulsed cavitation Ultrasound Therapy" (PCUT) (thérapie par ultrasons focalisés utilisant le phénomène de cavitation - effet mécanique-) est réalisable sur du tissu cardiaque in vivo en transthoracique de manière complètement non invasive. Nous devons travailler sur le vivant car le mouvement cardiaque est une des principales difficultés pour l'application de cette technologie. L'application de la PCUT in vitro (sur tissu statique) a déjà été réalisée à de multiples reprises (remplacement).

L'enjeu serait de proposer une thérapie non invasive (par ultrasons) pour traiter des pathologies cardiaques normalement traitées par chirurgie ou cathétérisme.

L'expérimentation sur gros animal, avec thérapie non invasive, est une étape indispensable pour améliorer notre technologie et valider son innocuité in vivo. De plus, nous avons besoin de travailler in vivo sur une anatomie cardiaque similaire à l'anatomie humaine (en termes de structures et de dimensions). Le modèle porcin est donc nécessaire. Dans l'objectif de suivre la règle des 3R, et donc de réduire au maximum le nombre de porcs : nous avons évalué à 15 porcs le nombre minimum de porcs requis pour ce projet. Ce nombre permettra de répondre aux objectifs scientifiques et techniques de ce projet sans utilisation supplémentaire d'animaux. La technique sera testée sur valve native des animaux.

Pour éviter toute souffrance aux animaux, ils seront sous anesthésie générale et analgésie pendant toute la durée de l'intervention. Des points limites sont définis et contrôlés de manière régulière.

L'application de notre thérapie par ultrasons sur des pathologies cardiaques, et sa validation, ouvrirait des nouvelles perspectives pour la prise en charge de ces pathologies chez l'homme (cardiopathie valvulaire) normalement traitées par chirurgie ou cathétérisme. Cela permettrait de proposer à long terme une solution thérapeutique non invasive et indolore (uniquement par ultrasons), sans chirurgie ni cathétérisme. Cette nouvelle approche si elle s'avère positive transformera la prise en charge des patients avec rétrécissement aortique calcifié

10365 Notre laboratoire est spécialisé dans le développement de stratégies de thérapie cellulaire, c'est à dire de méthodes de réparation de différents tissus grâce à l'utilisation de cellules souches. Nos travaux ont, par exemple, récemment permis l'initiation d'un essai clinique basé sur l'utilisation de cellules souches mésenchymateuses (MSC) associées à un biomatériau, chez des patients présentant des défauts de réparation de fractures osseuses.

Avec ce nouveau projet de recherche, nous souhaitons mettre à profit notre expertise en thérapie cellulaire pour développer de nouvelles stratégies de réparation d'un autre tissu : le muscle squelettique. Le muscle squelettique est le tissu le plus abondant du corps humain (30 à 40% de la masse corporelle) et assure des fonctions essentielles de l'organisme telles que la respiration, la marche ou encore la déglutition. En conditions normales, le muscle squelettique adulte possède une remarquable capacité de régénération, c'est-à-dire qu'il est capable de se reconstituer à l'identique même après une lésion importante. Cette capacité de régénération est due à la présence de cellules souches appelées Cellules Satellites (CS). Cependant, dans certaines conditions pathologiques et au cours du vieillissement, le muscle n'est plus capable de se réparer efficacement et perd sa fonctionnalité. Ce projet a pour but d'obtenir des données précliniques, qui contribueront à développer 2 stratégies de réparation du muscle en utilisant des CS autologues, c'est-à-dire obtenues à partir d'une biopsie du patient traité :

- La réparation musculaire par injection de CS : par exemple pour le traitement des lésions musculaires des sphincters responsables des incontinences urinaires et fécales.
- La reconstruction musculaire par implantation de CS associées à des biomatériaux, pour les cas de perte de masse musculaire importante (accidentelle ou post-chirurgicale).

Cependant, l'utilisation des CS en thérapie cellulaire est aujourd'hui encore limitée en raison du nombre très faible de CS qu'il est possible d'obtenir à partir d'une biopsie musculaire et de la difficulté de cultiver ces cellules in vitro tout en préservant leurs propriétés de cellules souches. Nous proposons donc d'utiliser des modèles de souris pour mieux comprendre le fonctionnement des CS in vivo, c'est-à-dire au sein de leur environnement dans le muscle. Ces expériences nous fourniront des informations cruciales pour reproduire au plus près cet environnement in vitro et ainsi mettre au point une méthode de culture des CS. Enfin, nous développerons un modèle de souris reproduisant les lésions des patients avec perte de masse musculaire importante, afin d'évaluer l'efficacité de notre stratégie de reconstruction par implantation de CS cultivées in vitro associées à des biomatériaux.

Dans ce projet nous utiliserons 2830 souris au total en appliquant la règle des 3R. Les protocoles expérimentaux ont été établis de façon à minimiser le nombre d'animaux tout en conservant un nombre suffisant pour assurer la reproductibilité et la cohérence statistique des observations et en s'efforçant d'utiliser tous les animaux issus des croisements. Une approche préalable de remplacement par des cultures cellulaires sera employée autant que possible, afin de réduire le nombre d'expériences incontournables réalisées sur l'animal. Les animaliers procèdent à une inspection visuelle hebdomadaire des cages pour vérifier l'état général des animaux et recherchent tout comportement anormal. Après les actes chirurgicaux, les animaux recevront un traitement antidouleur approprié, une attention particulière sera apportée à la phase de réveil, puis les animaux seront suivis quotidiennement.

10366 Chez l'Homme, on observe des altérations pulmonaires qui apparaissent spontanément au cours du vieillissement. Ces « altérations liées à l'âge » consistent essentiellement en une hypertension artérielle pulmonaire, une destruction des alvéoles pulmonaires (emphysème) et une fibrose pulmonaire. On dit des patients présentant ce type de lésion qu'ils ont une broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO). Pour ces trois altérations, aucun traitement curatif satisfaisant n'existe à ce jour et on prédit que la BPCO sera la troisième cause de décès dans les pays industrialisés d'ici 2020.

Nous souhaitons comprendre les raisons pour lesquelles, avec l'âge, ces altérations s'accumulent dans le poumon de ces patients. Des études menées au sein du laboratoire montrent que ces altérations sont dues à des cellules dites « sénescentes » qui arrêtent de proliférer, empêchant un renouvellement et une réparation du tissu. Ces cellules se mettent à exprimer des marqueurs spécifiques dont la protéine p21.

Nous avons des preuves qu'une protéine nommée Télomérase dont le rôle est de protéger les chromosomes, a un rôle dans le développement de la BPCO. Le but de ce projet est :

- 1) D'évaluer l'implication de la télomérase dans la maladie
- 2) De déterminer les voies de signalisation impliquées

Cette étude nécessite de travailler chez l'animal car aucun modèle cellulaire ne permet de mimer ces altérations pulmonaires observées chez les patients BPCO. De plus, elle nécessite de travailler sur des modèles d'animaux transgéniques uniquement disponibles chez la souris.

Cette étude nécessite d'induire les altérations pulmonaires provoquées lors de la BPCO (hypertension pulmonaire, emphysème, fibrose) séparément chez la souris. Nous utiliserons donc trois modèles différents :

- 1) L'exposition chronique à l'hypoxie qui permet d'induire l'hypertension artérielle.
- 2) L'exposition à la fumée de cigarette qui permet d'induire un emphysème pulmonaire.
- 3) L'injection de bléomycine qui permet d'induire une fibrose pulmonaire.

Des souris transgéniques qui expriment fortement la télomérase seront soumises à chaque modèle, et comparées à des souris contrôles. Les organes et cellules des souris seront analysés pour étudier les mécanismes impliqués. L'objectif final est d'évaluer si la forte expression de la télomérase est protectrice.

Dans cette étude, nous avons réduit au maximum le nombre d'animaux (240 souris au total) en utilisant par exemple les mêmes témoins pour deux expériences. Par ailleurs la méthodologie est raffinée en enrichissant l'environnement des souris et en mettant en place un arrêt des procédures en cas de souffrance de l'animale. Toutes ces souris seront surveillées quotidiennement. Les modèles d'exposition à l'hypoxie et à la fumée de cigarette n'induisent pas de douleur physique mais ils génèrent un stress. Si un comportement anormal est observé, l'animal est exclu du protocole. Pour le modèle d'exposition à la bléomycine, l'observation de l'un des points limites définis conduira à l'euthanasie de l'animal.

10367 L'hémostase regroupe l'ensemble des mécanismes physiologiques qui assurent le maintien du sang à l'intérieur des vaisseaux et en particulier, ceux qui déterminent l'arrêt du saignement lors d'une lésion vasculaire. Un dérèglement de ces mécanismes physiologiques peut conduire à la thrombose (occlusion du vaisseau). La plaquette sanguine est une cellule du sang qui joue un rôle fondamental dans ces mécanismes hémostatiques. Ainsi étudier les événements qui contrôlent l'activation des plaquettes sanguines et qui conduisent à la thrombose est essentiel afin de développer de nouvelles voies thérapeutiques pour réduire les risques thrombotiques. Lors d'une lésion vasculaire, les plaquettes en circulation entre en contact avec la paroi du vaisseau. Nous avons montré récemment chez un malade présentant une filaminopathie que se traduit par une mutation au niveau de la filamine A (FLNa), protéine qui joue un rôle essentiel dans le maintien de la cellule, que les plaquettes de ce malade présentaient un dysfonctionnement important. En effet, l'activation et l'agrégation des plaquettes du malade étaient beaucoup plus importantes que pour des plaquettes de témoins. Ces résultats suggéraient que ce malade avait un fort risque de thrombose. Comprendre les mécanismes impliqués dans cette "suractivation des plaquettes" et étudier le risque de thrombose chez ce malade est essentiel pour une meilleure prise en charge du malade et d'autres patients filaminopathie A présentant des mutations similaires de la filamine A. Le modèle de thrombose ne peut pas être fait chez l'homme. En revanche, un modèle de souris dont le gène codant pour la FLNa a été modifiée et remplacée par la FLNa mutée du patient permet d'étudier le risque de thrombose.

Dans ce projet et afin de répondre à la règle des 3R, les procédures se feront dans le cadre adapté d'un hébergement agréé, respectant au maximum le bien-être des animaux avec un milieu enrichi (morceaux de bois à ronger et filaments de papier kraft pour faire un nid). Le respect des méthodes anesthésiques et analgésiques limitera la souffrance. L'ensemble des expériences sera réalisé par une personne habilitée à l'expérimentation sur animaux. L'objectif est de limiter le nombre d'animaux nécessaire. Pour cela, nous pourrons réduire le nombre d'animaux en utilisant les mêmes souris dans plusieurs procédures. Enfin, des tests statistiques ont été réalisés pour chaque expérience afin d'utiliser au minimum le nombre d'animaux. Le nombre d'animaux prévu pour cette étude est de 448.

10368 Le système immunitaire désigne un ensemble de cellules qui vont coopérer pour défendre l'organisme contre les bactéries, virus ou parasites. Les cellules immunitaires ont aussi un rôle important dans le cancer, car au sein de la tumeur il y a plusieurs types de ces cellules. Nous

examinons en détail les propriétés d'un type de ces cellules, les lymphocytes T CD4 qui vont orchestrer les actions des autres types cellulaires au niveau de la tumeur. Notre objectif est d'étudier la biologie des cellules T et potentiellement d'augmenter leurs propriétés anti-cancéreuses. Pour ce faire nous nous intéressons à l'effet d'une protéine pro-inflammatoire appelée facteur de migration inhibitrice (MIF) sur la prolifération et les propriétés anti-cancéreuses des cellules T. Notre objectif est donc d'isoler ces cellules T CD4, de les différencier *in vitro* (dans des boîtes de culture) dans un type de T, les Th9 et d'augmenter fortement leurs propriétés anticancéreuses par l'augmentation de l'activité de MIF.

Elles pourront ensuite être utilisées comme outil thérapeutique dans la lutte contre le cancer. 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.

La mise en place de ce projet s'est attachée à respecter la règle des 3R. Nous avons choisi de réduire le nombre d'animaux dans notre projet en ne répétant les expériences que deux fois au lieu de trois, ce qui permet donc de réduire le nombre d'animaux de l'étude. Une grande partie des mécanismes moléculaires que nous étudierons *in vivo* seront étudiés *in vitro*, sur des cellules en culture ce qui permet de limiter au maximum d'animaux utilisés dans le projet (remplacement). Enfin, la totalité des procédures impliquant les animaux (injections) sera réalisée sous anesthésie, également les souris porteuses de tumeurs seront surveillées régulièrement afin de réduire l'inconfort potentiel à son minimum et ainsi permettre le raffinement de notre étude.

Au total, 464 souris seront utilisées dans ce projet.

10369 Les maladies auto-immunes connaissent actuellement une prévalence croissante, ce qui en fait un enjeu majeur de santé publique. Ce sont des pathologies complexes, le plus souvent multifactorielles et spécifiques d'un organe, rendant leur étude chez l'Homme difficile. Les traitements des maladies auto-immunes ont globalement pour objectif de contrôler et de réduire la réponse immunitaire et l'inflammation induites mais sans toutefois agir de façon spécifique sur la pathologie. Pour cela, il est important d'identifier et de caractériser au mieux les voies d'implication afin de cibler l'immunothérapie.

L'étude du rôle des molécules de co-stimulation dans la survenue de l'auto-immunité en général, dans le contrôle de la tolérance immunitaire et dans l'orientation de la réponse auto-immune vers un tissu déterminé est complexe et seule l'expérimentation animale permettra d'en étudier les mécanismes.

Nous nous focaliserons ici sur le diabète auto-immun (diabète de type 1) et la neuromyopathie auto-immune.

En premier lieu, nous créerons par croisement deux nouvelles lignées de souris invalidées pour le gène d'intérêt. Ces souris seront utilisées pour faire des expériences de transferts de la maladie auto-immune afin de caractériser les cellules et les voies immunitaires qui seront impliquées dans le développement de ces pathologies. Ces souris nous permettront également d'identifier et de mieux caractériser les cellules T impliquées dans ces pathologies.

Nous utiliserons différentes lignées de souris génétiquement modifiées afin de caractériser les mécanismes impliqués dans le développement d'une maladie auto-immune selon le tissu ciblé et les voies de co-stimulations impliquées, notamment celle de la molécule TIGIT. Nous cherchons ainsi à mettre au point une immunothérapie spécifique de l'auto-immunité.

Le nombre total de souris nécessaires au développement de ce projet sera de 402 animaux.

Pour cette étude, le nombre d'animaux utilisés est réduit au minimum en optimisant les statistiques et les groupes expérimentaux pour une interprétation scientifique correcte. De plus, afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux, les procédures de transfert de diabète se feront sous anesthésie générale. Enfin, des points-limites ont été établis, entraînant l'euthanasie anticipée de l'animal si nécessaire.

A terme, les résultats de ce projet permettront de comprendre plus précisément les mécanismes impliqués dans le développement des maladies auto-immunes et de développer une immunothérapie plus ciblée chez les patients qui en sont atteints.

10370 Le but de ce projet est d'obtenir une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires de la prolifération cellulaire et de la réparation de l'ADN. La prolifération cellulaire incontrôlée est une caractéristique des cellules cancéreuses, et leur capacité à réparer l'ADN suite aux traitements thérapeutiques (chimio et radiothérapie) est responsable de la rechute tumorale. Les mécanismes moléculaires qui gouvernent la prolifération cellulaire et la réparation de l'ADN sont actuellement mal compris. Afin de mieux comprendre ces mécanismes, le recours à l'expérimentation animale est nécessaire. Particulièrement pour ces études, nous avons recours au modèle animal de la grenouille (espèce *Xenopus laevis* ou xénope). En fait, les œufs pondus de cet animal possèdent la caractéristique unique de pouvoir reproduire de façon très fidèle et efficace les processus de copie de l'ADN qui est à la base de la prolifération cellulaire, ainsi que les processus de réparation de l'ADN, ce qui n'est pas possible avec les cellules humaines. Nos expériences utilisent des approches biochimiques et de biologie moléculaire qui permettent l'analyse fine des composants moléculaires des machineries de la copie et de la réparation de l'ADN. Nous utiliserons en total 300 animaux au cours des 5 prochaines années. Un nombre très restreint d'animaux est utilisé par expérience (maximum 4) pour collecter les œufs pondus. A la fin de la procédure expérimentale, les animaux sont retournés dans l'animalerie et mis au repos au minimum pendant 6 mois pour être ensuite réutilisés dans le protocole expérimental, ce qui permet de réduire de façon importante le nombre d'animaux utilisés. Les animaux présentant des signes de perte d'appétit/poids sortent du processus expérimental (points limites). Ils sont mis quelques jours dans un bac isolé avec une attention particulière.

10371 Les réseaux neuronaux de l'hippocampe sont cruciaux pour les fonctions cérébrales supérieures telles que les processus d'apprentissage et la mémoire. Ces processus permettant d'encoder, de stocker et d'utiliser une information sont essentiels à l'adaptation de chaque individu à son environnement en perpétuel changement. Le développement normal des réseaux neuronaux hippocampiques est donc vital pour la survie de l'individu et une perturbation de ce processus induit des troubles mnésiques. Etant donné l'impact sociétal des maladies de la mémoire, une meilleure compréhension des mécanismes régissant le développement et la plasticité neuronale représente une priorité croissante pour le traitement de ces pathologies.

Par ailleurs, il est maintenant bien établi qu'au sein du gyrus denté de la formation hippocampique, de nouveaux neurones sont formés et intégrés tout au long de la vie, un phénomène connu sous le nom de neurogenèse adulte. Il a récemment été montré que le gène *Mash1* est un important régulateur de la neurogenèse : la délétion de ce gène dans les cellules souches, obtenue grâce à un modèle de souris transgéniques bloque la formation de nouveaux neurones au sein du gyrus denté adulte.

Nous avons précédemment observé que ce blocage était associé chez les animaux âgés à des déficits mnésiques semblant se manifester lors de la présence d'interférences. En suite logique de ces résultats, le projet que nous proposons ici vise à tester l'impact de la réduction de neurogenèse consécutive à la délétion du gène *Mash1* dans les cellules souches sur la gestion des interférences dans des tâches mesurant les capacités mnésiques chez des souris âgées. Afin de déterminer si les déficits sont spécifiquement liés à l'âge, ces données seront comparées avec celles obtenues chez des souris jeunes. La réalisation de ce projet nécessite l'utilisation de 128 souris.

Afin de respecter le R de réduction, une même souris sera utilisée dans différents tests comportementaux. Dans un souci de Raffinement, les séquences comportementales seront organisées de façon à réduire au maximum l'inconfort des animaux et le personnel, formé, portera une attention particulière au raffinement des procédures afin de limiter la douleur, de soulager le stress des animaux et leur fournir les meilleures conditions de vie tout au long du projet. Pour leur bien-être, les animaux vivent en groupes sociaux et ont à leur disposition des éléments d'enrichissement de leur milieu. L'ensemble des animaux est surveillé quotidiennement avec une surveillance renforcée au cours des étapes de l'apprentissage, et accrue dès qu'un signe d'appel est constaté. Des points limites suffisamment précoces sont définis pour éviter des souffrances aux animaux avec la mise en place de mesures pour les soulager comme une réhydratation, le réchauffement, une nourriture adaptée, des traitements vétérinaires si nécessaire. Enfin par

définition, ce projet, qui vise à mesurer les capacités mnésiques, ne peut être conduit sur des cultures de cellules ou de tissus et le Remplacement animal n'est pas possible.

10372 L'embolie pulmonaire est le 3ème cas clinique le plus sévère des maladies cardiovasculaires en termes de risque de décès. L'incidence annuelle de l'embolie pulmonaire est de 100 à 200 pour 100 000 personnes. Dans les 7 pays majeurs (7MM), 475 660 cas ont été dénombrés en 2016. Dans les cas les plus graves, l'embolie pulmonaire entraîne une hypertension de l'artère pulmonaire et ainsi un dysfonctionnement cardiaque (ventriculaire droit) qui peut mener jusqu'au décès du patient en quelques heures.

Selon les guidelines de l'ESC (European Society of Cardiology) (2014), les patients ayant une déficience cardiaque après un événement thrombotique veineux ($\approx 5\%$ des cas), sont classifiés comme « à haut risque » de mortalité et sont traités en urgence par une thrombolyse (alteplase) induisant la lyse des caillots veineux. Ce traitement, d'une bonne efficacité pour lyser le caillot, présente un risque d'induction d'hémorragies cérébrales ($\approx 10\%$ des patients traités, pouvant atteindre 20% pour les personnes âgées), ce qui limite son utilisation uniquement aux patients à fort risque de décès. La plupart des patients ($\approx 70\%$) ne présente pas de déficience cardiaque à leur arrivée aux urgences. Ils sont identifiés « à faible risque » et ne seront traités qu'avec des anticoagulants permettant de prévenir la survenue d'un nouveau thromboembolisme. Le reste des patients ($\approx 20\%$) sont classés en risque « intermédiaire » et l'appréciation du traitement est variable par rapport au bénéfice/ risque du traitement thrombolytique avec alteplase. Ces patients ont cependant un risque de développer des problèmes cardiaques.

Il y a donc un fort besoin médical à traiter les patients ayant subi une embolie pulmonaire et classés à risque « intermédiaire » avec une thérapie thrombolytique sans risque hémorragique.

L'être vivant apporte des données physiologiques et comportementales nécessaires à la mise en évidence de l'action d'un composé dans l'organisme. Aucun modèle in vitro ne prédit une réelle activité in vivo. Le recours à l'animal est obligatoire pour connaître l'activité pharmacologique dans un organisme entier et vivant, avec l'ensemble des facteurs de la coagulation et de la fibrinolyse.

La validation d'un traitement thrombolytique (pro fibrinolytique) sans risque hémorragique nécessite l'utilisation de l'animal, et en particulier un modèle de thromboembolisme veineux.

L'objectif de ce projet est donc de mettre en place un modèle in vivo chez le rongeur, mimant le thromboembolisme systémique (création de plusieurs caillots disséminés dans le corps) puis de juger de l'efficacité curative de candidats médicaments.

Les produits sont sélectionnés en amont sur des modèles in vitro mais la modélisation de la lyse d'un caillot in vitro est peu prédictive. En effet, beaucoup de mécanismes hémodynamiques contrôlent la lyse et la formation d'un caillot et il est impossible de « mimer » cela in vitro. Le recours à l'animal est obligatoire pour connaître l'activité pharmacologique dans un organisme entier et vivant, avec l'ensemble des facteurs de la coagulation et de la fibrinolyse (ensemble des acteurs contrôlant la lyse d'un caillot).

L'utilisation d'un modèle de thromboembolisme systémique chez l'espèce souris présente un avantage en termes de temps d'expérimentation (une heure maximum) et d'obtention de résultats. Les moyens d'évaluer l'efficacité d'un traitement passe par une technique simple délivrant une valeur chiffrée autour d'un paramètre sanguin translatable à l'homme (D-dimères).

L'objectif de ce projet est de définir les conditions optimales visant à générer des micro-coagulations tout en évitant de mettre en détresse l'animal. Ainsi les doses d'agent inducteur seront évaluées sur la base des données historiques de ce protocole longtemps réalisé. Une surveillance et une observation accrue de l'animal par l'expérimentateur tout au long de la durée de l'expérience va permettre de détecter tout signe clinique anormal et d'appliquer le cas échéant les points limites pour éviter toute souffrance de l'animal.

Les souris bénéficieront d'un enrichissement du milieu avec des bâtons de bois à ronger, et tubes de coton cocoon pour nidifier. Elles seront également maintenues en groupes sociaux.

A l'heure actuelle aucun modèle ex-vivo ou in vitro ne peut mimer la pathologie humaine, l'usage d'un modèle animal est donc indispensable. L'ensemble des mises au point sera fait en étroite collaboration avec le service statistique pour la détermination du nombre d'animaux à intégrer dans

les études de mise au point puis d'efficacité du produit à tester (dépendant de la variabilité du paramètre mesuré (D-Dimères)).

Ce projet nécessite une première phase de validation du dosage du marqueur biologique sanguin (D-Dimères), puis une phase de détermination de la dose de l'agent inducteur de thrombose (facteur tissulaire), avec 100 à 200 souris environ. Les évaluations d'efficacité comprendront ensuite environ 200 à 300 souris pour l'étude d'un candidat médicament, selon les recommandations bio-statistiques, à raison de 1 étude par an. Ce projet va ainsi nécessiter un maximum de 1100 souris au total sur 3 années.

10373 Des études ont montré que le système nerveux périphérique pouvait réguler le système immunitaire (SI). En effet, la libération des neurotransmetteurs (tels que l'acétylcholine, l'adrénaline ou la noradrénaline) lors de la stimulation de nerfs périphériques peut agir directement sur les cellules du système immunitaire. Il a ainsi été montré que les organes lymphoïdes secondaires reçoivent une innervation importante de nerfs périphériques. Par ailleurs, on peut détecter l'expression de récepteurs à des neurotransmetteurs par les cellules du système immunitaire. Dès lors, l'intervention sur l'activité des nerfs périphériques dans le but de modifier l'activité du système immunitaire est envisageable. Ainsi, chez l'homme la stimulation de nerfs périphériques est déjà utilisée pour le traitement de maladies comme l'épilepsie ou la dépression. De nos jours, plus de 50 000 patients dans le monde sont implantés avec des micro-stimulateurs. Les effets de ces électrostimulations du nerf vague sont actuellement recherchés dans des maladies inflammatoires comme l'arthrite rhumatoïde. En effet, il a été montré que, dans des modèles d'inflammation chez la souris, l'électrostimulation du nerf vague induit une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires. De notre côté, nous avons montré que la stimulation du nerf splénique conduisait non seulement à la diminution de la production de cytokine inflammatoire suite à l'injection d'endotoxine bactérienne mais également à l'inhibition du développement de l'arthrite rhumatoïde dans un modèle murin.

Le but de notre projet est d'évaluer la possibilité de prévenir le diabète de type 1 (DT1) (maladie inflammatoire auto-immune) par stimulation du nerf apical ou artériel splénique chez la souris NOD. Cette souche de souris (non transgénique) a été sélectionnée car elle développe spontanément le DT1 (le maintien de la lignée fait l'objet de la procédure n°1).

Les différentes étapes du projet consisteront à implanter une électrode de stimulation au niveau du nerf splénique apical ou artériel et à réaliser une électrostimulation pour déterminer :

- 1- les conditions de stimulation électrique des nerfs spléniques optimales à l'inhibition développement du DT1 chez la souris NOD (procédure n°2) ;
- 2- le rôle des récepteurs beta adrénergiques dans l'inhibition du DT1 induite par l'électrostimulation des nerfs splénique (procédure n°3) ;

Le nombre total de souris utilisées pour ce projet est de 240. Des tests statistiques seront réalisés à la fin de chaque expérimentation pour réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. Par ailleurs des raffinements sont proposés notamment pour limiter l'inconfort ou la souffrance animale en mettant en place des protocoles adaptés d'enrichissement du milieu ou d'anesthésie et d'analgésie complétés par un suivi postopératoire comprenant la mise en place des points limites précoces et adaptés. Enfin, l'utilisation de l'animal est indispensable à la conduite de cette étude car elle nécessite la préservation de l'intégrité du système nerveux et immunitaire.

10374 La dépendance aux drogues est une pathologie complexe induisant une plasticité à long-terme du cerveau en réponse à l'usage répété de drogues. C'est une maladie multi-factorielle dont les conséquences humaines, sociétales et économiques sont particulièrement lourdes. Un défi majeur en neurosciences est d'en comprendre les bases moléculaires. Parmi les mécanismes neurobiologiques impliqués dans les comportements addictifs, nous étudions les processus épigénétiques incluant la méthylation de l'ADN, l'acétylation des histones et les micro-ARN. Il a été montré que la cocaïne induit des processus épigénétiques qui participent à la régulation de gènes et donc aux adaptations à long terme du cerveau. Par ailleurs, le cannabis, drogue illégale la plus consommée en France, interagit avec le système cannabinoïde endogène qui joue un rôle dans un grand nombre de fonctions, et notamment dans l'addiction. Dans ce système les récepteurs

cannabinoïdes sont impliqués dans la dépendance au cannabis et jouerait également un rôle dans les effets d'autres drogues. Dans ce contexte, nous nous intéressons aux rôles potentiels du système endocannabinoïde dans la mise en place des adaptations épigénétiques liées à la cocaïne. Notre objectif global est donc de comprendre ces mécanismes d'adaptation au niveau de structures du cerveau impliquées dans le circuit de la récompense dans le contexte de la dépendance à la cocaïne et d'étudier les interactions potentielles avec le système endocannabinoïde. Remplacement : Dans la mesure où nos travaux portent sur l'effet de drogues sur le cerveau, de leur dynamique neurobiologique et leurs substrats épigénétiques, il n'est pas possible de recourir à un autre type de modèle d'étude qu'à celui de l'animal entier. Raffinement : Nous avons optimisé le type de traitement chronique afin de limiter au maximum le nombre total d'injections reçues par les animaux et nous suivons tout particulièrement le site d'injection pour l'apparition de rougeur. Dans le cas de chirurgie, un suivi particulier des rats est réalisé au quotidien avec surveillance de paramètres physiologiques et comportementaux pouvant suggérer un mal-être de l'animal. Réduction : nous avons réduit au strict nécessaire le nombre d'animaux pour permettre notamment des analyses statistiques et avons adapté ce nombre selon le type d'expérience (10 rat/groupe pour les analyses de biologie moléculaire et biochimique et 12 rats/groupe pour le comportement de la prise volontaire de drogue). Dans ce contexte de la règle des 3R, nous anticipons que ce projet nécessitera au total 408 rats. Ce projet comporte 2 procédures expérimentales.

10375 Le carcinome hépatocellulaire (CHC) fait partie des cancers les plus mortels et les plus répandus dans la population humaine. En raison de la progression de l'obésité dans la population générale et de l'augmentation depuis une dizaine d'année de l'incidence de la NASH (Non-Alcoholic Steato Hepatitis), également appelée « maladie du foie gras » ou « maladie du soda », une augmentation de l'incidence du CHC est attendue dans les années à venir. Or, l'arsenal thérapeutique contre le CHC est très modeste et les quelques traitements existants ont une efficacité très limitée. Il est donc urgent d'envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Le projet consiste à évaluer différentes approches thérapeutiques dans un modèle expérimental de cancer du foie dans un contexte de NASH et de diabète chez la souris. Pour ce faire, un régime alimentaire très riche en graisses est introduit chez des souris de 4 à 5 semaines rendues diabétiques à la naissance. Les souris développent progressivement les différents stades de la pathologie hépatique : la stéatose (foie gras) puis la stéatohépatite (inflammation) puis la fibrose et enfin le stade CHC apparaissant chez les souris entre 16 et 20 semaines de vie. Les approches thérapeutiques seront mises en place à des stades bien définis en fonction de l'objectif attendu.

En cours de suivi, des prélèvements de sang seront réalisés notamment pour le suivi de l'évolution du diabète et de l'atteinte hépatique.

A différents temps, les souris pourront être euthanasiées et des prélèvements de tissus (foie principalement) et de sang pourront être effectués pour évaluer la progression de la pathologie et comparer les différentes approches thérapeutiques.

Pour ce projet, il est prévu un nombre maximal de 2100 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 cancers du foie dans un contexte de NASH.

Avant toute administration à l'homme, l'animal constitue un passage obligatoire pour l'évaluation de l'efficacité, de la toxicité et de la pharmacocinétique d'un candidat médicament. À ce jour, la souris est l'espèce la plus adaptée à ce type de modèle d'étude.

-Réduction :

•Un nombre minimal et 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.

•Seules les souris mâles sont incluses au protocole expérimental. Le sexage des souris sera réalisé dès que possible après la naissance (par exemple au 2^e jour, juste avant l'injection de streptozotocine) ce qui permettra d'éviter d'injecter de la streptozotocine aux souris femelles, qui pourront alors être réutilisées dans d'autres projets.

-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 et moins douloureuses possibles
- la mise en place de points limites adaptés et le suivi des signes cliniques
- le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire.

10376 Les liens entre le système immunitaire et la dépression sont soupçonnés depuis longtemps. En effet, lors d'une atteinte du système immunitaire, se développe un comportement dit de type « maladie » (« sickness behavior » en anglais), qui se caractérise par un certain nombre de symptômes communs avec ceux rencontrés lors d'une dépression diagnostiquée chez les patients : retrait social, perte d'appétit, ralentissement, repli sur soi.... Néanmoins, la preuve directe entre l'atteinte immunitaire qui se caractérise par l'augmentation de facteurs appelés cytokines et la dépression n'a pas été encore formellement apportée.

Pour vérifier cette hypothèse et mieux comprendre les effets de la neuroinflammation sur le comportement émotionnel, nous proposons de développer un projet chez la souris C57BL/6/J qui porte sur les effets de composés capables de déclencher ou de traiter une inflammation et d'observer les effets comportementaux et biochimiques. Ce projet ayant pour but d'étudier des phénomènes psychiatriques et des processus pathologiques, les méthodes alternatives actuelles sont insuffisantes. Les modifications cérébrales et comportementales complexes étudiées s'inscrivent dans le cadre d'une étude intégrée et doivent donc être réalisées chez des animaux.

Pour cela, nous traiterons des souris C57BL/6J adultes âgées de 8 semaines (240 sur 2 ans) avec un composé qui induit une neuroinflammation, le LPS (lipopolysaccharide). Nous utiliserons des doses faibles de LPS pour induire une inflammation à bas bruit qui mime celle observée chez des patients dépressifs. Nous mesurerons le comportement de type dépressif et le comparerons avec celui des souris n'ayant reçu que le véhicule de ce composé.

Les cerveaux de ces mêmes souris seront prélevés afin d'effectuer des analyses neurochimiques et de mesurer les biomarqueurs endogènes de la neuroinflammation que sont les cytokines. Les cytokines sont les messagères du système immunitaire, certaines servant à déclencher l'alarme qui conduira à l'inflammation (cytokines pro-inflammatoires), d'autres à stopper cette même alarme (cytokines anti-inflammatoires).

Les analyses comportementales seront effectuées à l'aide de matériels et de logiciels dédiés qui permettent d'automatiser les procédures et d'avoir une meilleure reproductibilité des données et de diminuer le nombre de souris requis. Les analyses neurochimiques seront réalisées chez les souris dont le comportement a été analysé, afin de ne pas augmenter le nombre d'animaux. Les souris seront observées quotidiennement. Une grille précise d'évaluation des points limites sera utilisée. Tout signe de douleur ou de souffrance chez les animaux sera soulagé avec des analgésiques.

Au terme de ce projet nous espérons déterminer les interactions moléculaires entre la neuroinflammation et la dépression. Traiter la neuroinflammation pourra être une piste de traitement de la dépression.

10377 L'invasion de cellules par des pathogènes, les différents types de cancer et l'auto-immunité représentent des menaces continues pour les populations humaines. Parmi les différents moyens que l'organisme utilise pour leur résister, un des plus importants est la reconnaissance des cellules malades par les cellules du système immunitaire et ensuite, leur élimination. Pour les éliminer de façon efficace, les cellules T du système immunitaire doivent effectuer une série d'étapes pour être activées. Nous avons identifié une molécule, IRAP, qui était connue pour avoir un rôle important dans d'autres cellules du système immunitaire mais qui n'a jamais été étudiée auparavant dans les cellules T. Nous avons démontré dans une lignée cellulaire T qu'IRAP interagit avec d'autres molécules importantes pour la bonne fonction des cellules T et que de plus, l'absence d'IRAP conduit à des altérations majeures dans l'activation des cellules T. Pour confirmer ces résultats et leur effet sur la capacité des cellules T cytotoxiques à éliminer des cellules malades dans un organisme, nous avons besoin d'utiliser des souris inactivées pour IRAP uniquement dans les

cellules T, les souris IRAP-lox-Lck-cre+. Nous avons besoin d'utiliser des souris contrôle en même nombre, mais qui viennent de mêmes parents pour avoir un fond génétique le plus homogène possible, les souris IRAP-lox-Lck-cre-. Le nombre total de souris utilisées sera 44. Nous allons injecter ces souris par la voie sous-cutanée avec des cellules tumorales EG7-ova qui expriment une molécule spécifique. Quinze jours après l'injection les souris auront développé une tumeur ce qui nous permettra après euthanasie des souris et isolation de cette tumeur d'analyser les cellules T qui ont reconnu cette molécule avec un anticorps spécifique. Ce type de tumeur a déjà été développé chez la souris est le phénotype n'est pas dommageable. Ces expériences vont démontrer si le rôle d'IRAP in vivo dans les cellules T est essentiel pour avoir des cellules T qui reconnaissent et peuvent éliminer les cellules malades. La vérification de l'importance d'IRAP pour l'activation de cellules T est cruciale et pourrait nous fournir des nouvelles stratégies de lutte contre le cancer ou l'auto-immunité.

Pour ce projet, il n'y a pas la possibilité de remplacer les animaux par un modèle expérimental in vitro parce que nous voulons étudier l'activité des cellules T cytotoxiques dans le cadre d'un organisme qui développe une tumeur. Pour effectuer ce projet nous avons réduit le nombre d'animaux utilisés au plus bas possible pour qu'on puisse avoir des résultats statistiquement significatifs. Pour cela, nous avons besoin d'effectuer au moins trois expériences indépendantes avec 5 souris par souche et par expérience. De plus, nous avons besoin de 4 souris contrôle auxquelles nous allons injecter des cellules tumorales contrôle, qui vont développer une tumeur mais qui ne vont pas présenter la molécule spécifique, pour vérifier la spécificité de notre anticorps. Nous avons aussi besoin de 5 souris par souche pour faire une caractérisation des cellules T de ces souris à l'état de base, dans les ganglions, la rate et le thymus. Les animaux seront gardés en permanence en groupe, dans leurs cages habituelles, dans un milieu enrichi avec de l'eau et de la nourriture à volonté. Nous allons surveiller les animaux chaque jour. Si toutefois, nous observons qu'une tumeur dépasse un volume de 2500mm³ ou qu'un animal présente des signes de douleur ou de détresse, nous procéderons à son euthanasie. Nous évaluerons la souffrance de l'animal à l'aide d'une grille et dans le cas d'un animal en souffrance nous allons considérer l'euthanasie. La durée maximale du projet sera de 1,5 ans et son volet scientifique a été approuvé et financé par l'Agence Nationale de la Recherche.

10378 Pour toutes les situations dans lesquelles la réparation spontanée de grande perte osseuse est difficile, voire impossible, l'utilisation de transferts osseux vascularisés ou des techniques de transport osseux par système de fixation externe sont proposées aux patients par les chirurgiens orthopédiques. Cependant, ces approches thérapeutiques, souvent longues et contraignantes, représentent un enjeu médical et socio-économique majeur. Une de ces solutions thérapeutiques est la technique de reconstruction osseuse. Elle consiste en la reconstruction d'une perte de substance osseuse importante grâce à un protocole en deux temps opératoires. Le premier temps opératoire consiste à interposer du ciment chirurgical, dans la zone de résection osseuse stabilisée au préalable par un système de fixation (plaque, clou ou fixation externe). Autour de ce ciment se forme progressivement une membrane appelée membrane induite (MI). Le deuxième temps opératoire consiste à retirer le ciment en respectant la membrane induite et à interposer des greffons osseux dans l'enveloppe formée par la membrane et ainsi d'induire un régénérat osseux. Nous souhaitons miniaturiser chez la souris le modèle de reconstruction osseuse par MI. En effet, la mise en place d'un modèle de MI chez des souris sauvages (C57BL/6j), nous permettra d'avancer vers une étude ciblée des événements cellulaires et moléculaires impliqués dans ce processus de régénération osseuse par MI notamment aux nombreux modèles murins transgéniques établis et utilisés en recherche. La complexité de ce système ne peut actuellement être appréhendée par des méthodes in silico ou in vitro.

Au total, 80 souris seront utilisées pour la génération du modèle de MI dont 20 témoins.

La taille de chaque groupe (20 animaux) a été réduite au maximum pour obtenir suffisamment de résultats exploitables tout en évaluant sur les mêmes animaux un grand nombre de paramètres, tels que l'organisation architecturale des MI, la présence de zone de minéralisation, l'activité des précurseurs osseux. Au cours de cette étude, toute souffrance susceptible d'apparaître sera traitée en amont par l'utilisation d'antalgique adapté. Les animaux seront hébergés dans un milieu enrichi

de stabulation (litière permettant de nidifier, fond sonore musical, tube en carton offrant une cache) pour favoriser le bien-être des animaux.

10379 Dans notre projet nous proposons l'amélioration et l'avancement d'une nouvelle méthode de radiothérapie. La radiothérapie, outre la chirurgie et la chimiothérapie, est le traitement le plus efficace afin d'augmenter la survie médiane des patients atteints par le glioblastome, la tumeur intracrânienne la plus agressive. Malgré la mise en place des protocoles radicaux de traitement, les patients ne survivent en moyenne que 14 mois après le diagnostic. Pour cette raison nous cherchons à optimiser la radiothérapie en utilisant une source de rayons X permettant de faire un micro-fractionnement spatial de la dose grâce à un haut débit de dose. Il s'agit donc d'un nouveau mode de radiothérapie par microfaisceaux. Cette spécificité n'est pas techniquement possible sur les sources classiques hospitalières à l'heure actuelle (bas débit de dose). Cependant, notre traitement a montré une efficacité de contrôle tumoral significativement élevée par rapport à la radiothérapie conventionnelle, en préservant le tissu sain autour de la tumeur. Cette amélioration de contrôle tumoral a été constatée par la diminution du volume tumoral et l'augmentation de la survie médiane de rats traités aux microfaisceaux.

Nous explorons le potentiel et l'optimisation de cette technique depuis une quinzaine d'années déjà, selon des approches de dosimétrie expérimentale et irradiation de cellules en culture. Ces approches bien qu'indispensables restent très limitées car elles ne prennent pas en compte la complexité du tissu tumoral ainsi que du tissu sain, se développant de façon autonome, possédant sa propre vascularisation etc. De fait, l'utilisation de modèles précliniques de rongeurs (rats) permet de tester les modalités d'imagerie (diagnostique), les modalités d'irradiation (géométrie, balistique, dose) et les protocoles de thérapie visant à augmenter la sécurité du patient relativement à la dose délivrée.

Ce projet est composé de 2 procédures expérimentales et requerra l'utilisation d'un maximum de 660 rongeurs sur 5 ans.

Réduction : Ce nombre d'animaux a été déterminé de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en gardant suffisamment pour ne pas compromettre la validité des expériences qui seront menées.

Raffinement : Le projet implique la mise en place d'une irradiation du cerveau de rat de classe légère. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et évalué grâce à une grille codifiant le niveau de douleur. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance.

Remplacement : Ce projet a pour but d'évaluer la radiotoxicité de notre modèle d'irradiation sur le tissu cérébral en comparaison avec la radiotoxicité de la radiothérapie conventionnelle. Ces effets seront analysés par le comportement des animaux. De ce fait, il est impossible de remplacer notre préparation in vivo par un modèle cellulaire ou une simulation computationnelle.

10380 La compréhension du comportement de l'anguille européenne (*Anguilla anguilla*) dans le Rhône est de première importance pour aider à la restauration des stocks en minimisant les impacts anthropiques sur la dynamique des populations de cette espèce. Un des impacts anthropiques majeurs sur le Rhône est la succession des aménagements hydroélectriques. Les barrages génèrent des ruptures de connectivité tant en direction de l'amont qu'en direction de l'aval. Beaucoup d'efforts et de progrès ont été réalisés sur les obstacles pour restaurer la migration des jeunes anguilles vers l'amont. Moins d'efforts ont été consacrés à la dévalaison des adultes de plus de 4 ans (anguilles argentées) pour rejoindre la mer. L'idée de notre projet est d'évaluer les routes de dévalaison de ces anguilles adultes à travers les aménagements hydroélectriques sur le Rhône, certaines routes étant plus dangereuses que d'autres (ex le passage dans les turbines) et d'évaluer les proportions d'individus qui arriveront en mer.

L'objectif de l'étude présentée ici est (1) de capturer et marquer 100 anguilles par an pendant trois ans (implantation chirurgicale d'une marque émettrice de 12 g à 24 g selon la masse de l'individu à marquer), préalablement identifiées comme en cours d'argenture ou argentées (> 3-4 ans minimum, souvent plus, avec une masse > 600 g) en amont de l'aménagement de Caderousse (fleuve Rhône), (2) de relâcher les individus marqués sur leur lieu de capture ou plus en amont, (3) d'enregistrer

leur passage dans une des routes de dévalaison possibles à travers l'aménagement hydroélectrique (principalement par les turbines de l'usine ou par le Rhône court-circuité) et (4) d'évaluer la proportion d'individus dévalant qui arrivent en Arles (équivalent de l'arrivée en mer Méditerranée). Pour ce faire, des portes de détection seront installées sur le linéaire des différentes routes de dévalaison possibles et en Arles. Les portes de détection sont des passages « obligés » pour les anguilles ayant entamé une dévalaison au niveau desquelles seront installés des hydrophones qui détectent les émissions sonores des marques implantées dans les anguilles. Pour mieux évaluer le comportement des anguilles entre le marquage et le début de leur dévalaison, des campagnes de suivi mobile (détection des marques par déplacement en bateau) seront organisées pour tenter de localiser les individus.

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

- « R » de « Remplacement »

La question écologique posée est d'étudier le comportement individuel des anguilles argentées en dévalaison dans le Rhône. De ce fait, il n'est pas envisageable de réaliser cette expérimentation sur d'autres individus, ni de réaliser ces expérimentations en conditions contrôlées (fluvarium par exemple). L'absence de connaissances quantitatives sur les routes de dévalaison empruntées par les anguilles argentées annule également toute possibilité de modélisation.

- « R » de « Raffinement »

Une étude préliminaire a montré que le marquage des poissons proche de leur lieu de capture limitait les manipulations des poissons. Les poissons marqués restent en stabulation dans de grands bacs alimentés par l'eau du Rhône avec de faibles abondances par bac. Ce protocole réduit les risques d'agressivité entre les individus et le stress lié au changement de qualité d'eau. Le fait d'être proche du lieu de capture réduit aussi le temps entre la récupération post-marquage et le retour au milieu naturel. De nombreuses études préconisent le retour des animaux marqués au plus vite dans le milieu naturel.

Toutes les manipulations se feront sous sédation et anesthésie (adaptée à la procédure de marquage, taille du sujet et température ambiante) selon des protocoles standardisés validés chez l'anguille (impacts limités sur la survie et le comportement). Les protocoles sont développés pour limiter la durée de l'opération, le temps entre capture et lâcher et le transport entre lieux de capture et de lâcher, afin de réduire les risques d'infection et les biais comportementaux. L'ensemble des poissons ne sera remis à l'eau qu'après contrôle de l'état sanitaire.

- « R » de « Réduction »

La variabilité des conditions environnementales, les mortalités cumulées entre le marquage et l'arrivée des poissons en Arles (franchissement de 3 aménagements) et les pertes de contacts avec les individus marqués (souvent autour de 20 % min.) font que 100 poissons marqués par an (donc 300 anguilles argentées marquées au total) nous semble un bon compromis.

10381 L'infection à cytomégalo virus (CMV) chez le patient immunosupprimé dans le cadre de la greffe d'organe ou de moelle osseuse représente un risque majeur de complication pouvant entraîner la perte du greffon voire le décès du patient. Dans ce contexte, l'analyse de l'ensemble des acteurs cellulaires de la réponse immunitaire chez l'homme reste une priorité afin de définir de nouvelles approches thérapeutiques.

Parmi les lymphocytes T chez l'homme, une petite fraction a une activité anti-CMV et anti-tumoral. Néanmoins peu de choses sont connues concernant les cibles moléculaires de ces lymphocytes.

Afin d'identifier les antigènes humains reconnus par ces lymphocytes T sur les cellules cibles, il est indispensable de passer par une étape d'immunisation d'animaux suffisamment éloignés de l'homme. Les antigènes injectés à la souris permettent de générer une réponse immunitaire forte et de produire les anticorps indispensables pour identifier les cibles moléculaires.

Une fois les antigènes identifiés, il est possible d'envisager la production d'un vaccin afin de renforcer la réponse immunitaire anti-cytomégalo virus chez les patients transplantés ou à risque (femme enceinte non immunisée.). Le développement d'un vaccin prend de nombreuses années.

Il n'est pas possible de remplacer l'étape d'immunisation des souris car il est nécessaire de générer des anticorps chez l'animal. Cependant cette procédure est équivalente à une vaccination et elle ne dure que 15 jours. Le protocole d'immunisation utilisé permet de réduire le nombre de souris à

2 au lieu des 5 dans le protocole classique. L'expérience a montré que cette immunisation ne conduit jamais à une détérioration de l'état général des animaux et n'a jamais nécessité la mise en œuvre de médication dans le but de réduire douleur, souffrance ou angoisse. Enfin les animaux sont hébergés à l'animalerie et surveillés quotidiennement pour tout signe de douleur qui sera traité par antalgique.

Sur une période de 5 ans, 60 souris seront utilisées.

10382 Les troubles de l'anxiété sont des problèmes courants de santé mentale qui agissent sur notre capacité à travailler et sur notre productivité. Dans le monde, plus de 260 millions de personnes présentent des troubles de l'anxiété. L'impact social et économique de ces troubles est donc considérable, et nécessite un accès fréquent aux hospitalisations. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a publié une étude qui révèle qu'en soignant ces troubles, les gains pour l'économie mondiale seraient de 2 à 4 fois supérieurs aux dépenses engagées. Elle souligne également l'importance de respecter et promouvoir la dignité des personnes atteintes de troubles mentaux. Cet accompagnement nécessite en partie de développer de nouveaux traitements afin de corriger ces troubles. La plupart des recherches se sont focalisées sur le dysfonctionnement de régions spécifiques du cerveau à l'origine de ces troubles mentaux. En revanche, de nombreuses études, dont celles publiées par notre laboratoire, suggèrent que ces pathologies doivent être abordées sous l'angle d'une dérégulation de l'activité de circuits neuronaux bien précis. Au centre de ces réseaux l'aire tegmentale ventrale (ATV), connue pour son implication dans les comportements adaptatifs semble émerger comme une région-clé d'intégration des informations extérieures, et est elle-même dérégulée dans les troubles mentaux. Les approches modernes visant à moduler l'activité du cerveau permettent d'envisager dans un futur proche de nouveaux traitements.

Le stress et la nicotine sont des facteurs de risques qui précipitent les troubles mentaux en perturbant l'équilibre fonctionnel du cerveau. Notamment une exposition chronique au stress, et un sevrage suite à une absorption chronique de nicotine entraînent tous deux l'apparition d'une anxiété élevée. De plus, il existe une forte comorbidité entre addiction à la nicotine et troubles mentaux liés au stress, c'est-à-dire que le pourcentage de fumeurs est beaucoup plus élevé chez les personnes stressées que dans la population générale. Également, certains facteurs génétiques exacerbent la sensibilité au stress et à la nicotine, et donc prédisposent fortement un individu à développer des troubles mentaux. Afin de comprendre les mécanismes par lequel stress et nicotine, deux facteurs environnementaux fréquemment rencontrés dans nos sociétés modernes, entraînent des troubles de l'anxiété, notre équipe s'intéresse à une structure cérébrale, l'aire tegmentale ventrale, et aux régions qui lui sont connectées.

Nos travaux combinent différents niveaux d'analyse, de l'échelle cellulaire à l'échelle comportementale, afin de disséquer le rôle de l'ATV dans ces pathologies. Le présent projet aura donc trois objectifs principaux : i) Étudier les changements d'activité causés par le stress et la nicotine sur l'équilibre de l'ATV. ii) Déterminer le rôle d'un facteur génétique dans la facilitation des effets du stress et de la nicotine. iii) Étudier le potentiel bénéfique thérapeutique de cibler ces circuits neuronaux afin d'améliorer les troubles comportementaux liés au stress et à la nicotine

Pour parvenir à ces objectifs, notre projet sera découpé en 3 procédures. i) Procédure 1 : Effets du stress et de l'exposition chronique à la nicotine et son sevrage sur l'activité des neurones du LDTg et de l'ATV. Dans cette procédure électrophysiologique, nous mesurerons les changements d'activité des neurones au sein de trois structures cérébrales reliées entre elles. ii) Procédure 2 : Mesurer l'impact d'un facteur de risque génétique sur les réponses comportementales et cellulaires au stress et à la nicotine et son sevrage. iii) Procédure 3 : Contrecarrer les effets comportementaux et cellulaires du stress et de la nicotine et son sevrage via des stimulations du cerveau.

L'ensemble du projet nécessitera jusqu'à 2996 souris mâles adultes conventionnelles. Les procédures présentées dans ce projet ont été pensées afin de prendre en compte les objectifs de la règle des 3R :

Remplacement : La souris est le modèle le plus adéquat pour cette étude car la complexité des structures et circuits cérébraux dérégulés par le stress et la nicotine chez l'homme est conservée chez la souris.

Réduction : Chaque souris est utilisée dans autant de procédures qu'il est envisageable sans qu'elles interfèrent entre elles, dans le but de limiter le nombre d'animaux. Les tests statistiques sont choisis afin d'obtenir la meilleure significativité avec un minimum d'individu.

Raffinement : Les résultats comportementaux dépendent directement du niveau de stress non contrôlé des animaux. Nous portons donc une attention particulière aux conditions d'hébergement et de soin des animaux, ainsi qu'à la diminution du stress et de la douleur à leur minimum pour chaque procédure (suivi quotidien via grille de score en annexe, définition de points-limite précoces et adaptés).

10383 L'accident vasculaire cérébral (AVC) est une pathologie du système neuro-vasculaire qui fait une victime toutes les dix secondes dans le monde (OMS, 2007). Il est la troisième cause de mortalité, la deuxième cause de démence et la première cause de handicap acquis chez l'adulte dans les pays industrialisés (OMS, 2012). Cette pathologie pose un problème majeur dans le domaine de la santé publique. Les seuls traitements autorisés actuellement sont : 1) un traitement pharmacologique permettant la lyse du caillot sanguin par administration de l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) ; 2) un traitement chirurgical par voie endoscopique (la thrombectomie).

Il a été montré depuis peu que le tPA existe sous deux formes : une forme simple chaîne (sc-tPA) et une forme double chaîne (tc-tPA), ces deux formes pouvant avoir des propriétés différentes lorsqu'injectées lors de la thrombolyse. En effet, des travaux réalisés in vitro montrent un effet différent de ces deux formes de tPA sur la mortalité neuronale. Le tc-tPA apparaissant bénéfique pour les neurones alors que le sc-tPA apparaît délétère.

Lors de la thrombolyse, les deux formes de tPA sont injectées, dans des proportions différentes selon les pratiques hospitalières. Une étude clinique (OPHELIE) a depuis été menée. Cette étude visait à mesurer le taux de sc-tPA et de tc-tPA reçu par chaque patient, et de corrélérer cela au devenir des patients en termes de récupération et de survenue de complications. Cette étude a confirmé une différence d'action entre sc- et tc-tPA, notamment au niveau de la survenue d'hémorragie et de crises d'épilepsie chez les patients après traitement.

Ce projet a pour but d'étudier la différence de mode d'action et les effets du sc- et du tc-tPA lors d'une thrombolyse après un infarctus cérébral, en vue d'une amélioration des pratiques cliniques.

Pour cela, les effets du sc- et tc-tPA seront étudiés à l'aide d'un modèle d'infarctus cérébral qui reproduit au mieux la physiopathologie humaine de l'AVC, dans lequel un caillot sanguin est directement produit dans la lumière artérielle. Cette étude sera réalisée chez la souris du fait que ce modèle ait été développé et très bien caractérisé dans cette espèce. Les procédures seront organisées afin que toutes les manipulations douloureuses soient réalisées sous anesthésie générale associée à une couverture analgésique. Plusieurs paramètres seront évalués lors de cette étude : l'atteinte fonctionnelle grâce à une mesure de leur force motrice (sur une période de 7 jours), le volume de lésion grâce à l'imagerie par résonance magnétique (à 24 heures) et l'inflammation cérébrale ainsi que la survenue d'hémorragies cérébrales par immunohistochimie. Ces analyses seront effectuées dans 4 conditions différentes incluant 15 animaux par groupe soit un total de 60 souris pour l'étude complète.

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. Un modèle in vivo est indispensable afin de pouvoir évaluer la reperfusion cérébrale ainsi que la récupération fonctionnelle. 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 les effets des différentes formes de tPA. Notre projet correspond à une étape de validation in vivo qui fait suite à des validations réalisées in vitro et sur la base d'observations cliniques, et ne nous permet pas d'utiliser d'autres moyens que de tester notre modèle chez l'animal. Les données de la littérature utilisant ce modèle ainsi qu'une étude de puissance statistique en amont, permet de nous assurer que nous utilisons le nombre minimal d'animaux pour pouvoir conclure d'un effet de notre stratégie thérapeutique. Le bien-être des animaux sera suivi bi-quotidiennement par du personnel formé 7j/7. Les animaux sont hébergés

dans des cages standards aux normes européennes suite à la chirurgie. Les principes éthiques et les standards de raffinement sont utilisés jusqu'à l'euthanasie de l'animal.

Mots clefs : Accident Vasculaire Cérébral ischémique ; tPA ; IRM

10384 Ce projet a pour objectif d'étudier les réorganisations tissulaires au niveau de lésions cutanées à la suite d'une injection de cellules souches olfactives autologues. Ce type de lésion est fréquent, que ce soit chez l'homme ou les animaux, et même dans de bonnes conditions de traitement, le processus de guérison peut être lent et mener à la formation de fibrose et de cicatrices.

La bibliographie indique que des cellules souches injectées au niveau de la lésion permettent une régénération plus rapide et peuvent même permettre de limiter la formation de cicatrice, mais les mécanismes précis en étant à l'origine doivent être éclairés. Toutefois, le type de cellules souches utilisé est remis en question. Celles originaires de la moelle osseuse ou du tissu adipeux sont les plus utilisées. Pour les premières, le prélèvement est complexe et douloureux, pour une collecte d'une faible quantité de cellules. Pour les deuxièmes, bien que le prélèvement soit plus simple et relativement indolore, il permet de collecter peu de cellules souches qui sont directement réinjectées au niveau de la lésion après un tri sommaire. Il en résulte que peu de cellules sont finalement injectées.

Récemment, il a été mis en évidence des cellules souches au sein de la muqueuse olfactive, facilement accessible chez de nombreux mammifères, dont le lapin, et simple à purifier et amplifier in-vitro. Ces cellules possèdent la capacité de se différencier en différents types cellulaires.

Le but de cette étude est d'évaluer les effets biologiques induits par l'injection de cellules souches afin de développer des techniques de thérapie cellulaire à même d'améliorer le bien-être des sujets en cas de lésion cutanée. Ce projet a aussi pour objectif d'étudier les modifications physiologiques induites par l'utilisation de cellules souches pour guérir les plaies.

A travers cette étude, nous mettrons en lumière certains mécanismes liés à l'utilisation de cellules souches, afin de développer par la suite les techniques les mieux adaptées pour la thérapie cellulaire vétérinaire et humaines. Pour mener à bien ce projet, visant à évaluer autant les bénéfices fonctionnels qu'à explorer et expliquer les raisons biologiques de ces améliorations, nous envisageons d'inclure 15 lapins, une espèce pour laquelle existe différents modèles validés de lésion cutanée. Cela nous permettra d'évaluer les réorganisations tissulaires après injection de cellules souches et de mettre en lumière les mécanismes sous-jacents pour optimiser les techniques de traitement. Cette taille d'échantillon a été calculée selon les résultats observés dans la bibliographie afin de pouvoir observer des différences significatives sur les paramètres de l'étude. Le nombre d'animaux inclus dans l'étude est réduit au maximum, tout en disposant de groupes suffisant pour obtenir des résultats statistiquement exploitables. Afin de s'assurer du bien-être des animaux durant l'ensemble du projet, ceux-ci seront suivis quotidiennement par un vétérinaire et une équipe animalière. L'ensemble des procédures d'opérations se déroulera sous anesthésie générale et en présence d'anti douleur. Notre projet se focalisant sur les effets des cellules souches sur un modèle lésionnel fréquemment utilisé sur le lapin et l'observation de l'évolution du traitement étant un critère primordial, l'utilisation de cette espèce est nécessaire. Cependant ce projet apportera des informations sur les solutions thérapeutiques envisageables pour lutter contre des atteintes qui sont courantes chez l'homme, ainsi que d'autres espèces.

10385 Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) sont des composés organiques polluants issus de différents processus industriels. Ces pollutions constituent des mélanges d'une centaine de composés. Les voies d'exposition humaine sont multiples mais les aliments représentent la principale source d'exposition. Plusieurs études épidémiologiques indiquent un lien entre HAP et diabète : une corrélation a été montrée entre une forte concentration urinaire de métabolites des HAP et une prévalence significativement plus importante de diabète. Compte tenu de l'importance croissante du diabète de type II dans le monde, comprendre l'impact des facteurs environnementaux (et surtout des effets cocktails) et les mécanismes moléculaires impliqués constituent un enjeu de santé publique majeur.

Le but de l'étude est de comprendre les relations entre une exposition à des mélanges complexes de HAP et la survenue d'atteintes métaboliques, dans un contexte d'alimentation riche en graisse

(facteur de risque de la survenue d'atteintes métaboliques). Le mélange de HAP étudié provient d'un prélèvement réalisé sur un site industriel contaminé. Sa composition en HAP est caractérisée et il contient également d'autres nombreux polluants, chacun en quantité mineure. De ce fait, ce mélange sera comparé (1) à un mélange synthétique dont la composition en HAP sera identique (qualitativement et quantitativement) au mélange réel prélevé sur site ainsi que (2) au Benzo(a)Pyrène (BaP) seul, HAP de référence. Cette approche permettra de voir si la complexité du mélange modifie ou pas les potentiels effets métaboliques observés avec le BaP. L'étude des effets cocktails est une problématique majeure de la toxicologie contemporaine et ce projet permettra d'apporter des éléments sur la méthodologie à mettre en place pour répondre à cette question complexe.

Le rat est le modèle de référence en toxicologie. Après différentes phases d'acclimatation, ces rats seront nourris avec un régime riche en graisse et soumis aux polluants. Différents facteurs lipidiques, hépatiques et inflammatoires seront analysés à partir d'un simple prélèvement sanguins et d'urines et fèces récoltés. Des poils pourront également être prélevés afin de réaliser les dosages des métabolites. Après 9 semaines d'exposition, le protocole prendra fin, les rats seront euthanasiés en utilisant une méthode réglementaire sans souffrance. Le sang sera prélevé post-mortem pour réaliser notamment une étude de métabolomique. Cette étude nous permettra d'évaluer (1) les changements métaboliques induits par les HAP et (2) si une exposition à des mélanges complexes potentialise les effets observés avec un seul HAP (BaP).

L'impact de mélanges complexes de HAP ne peut pas être évalué uniquement in vitro d'une part à cause de l'importance de la prise en compte de la toxicocinétique des polluants (Absorption, Distribution, Métabolisme, Elimination) et d'autre part du fait de la complexité des voies métaboliques et de régulations impliquées dans l'apparition du syndrome métabolique et/ou du diabète de type II, qui font appel à plusieurs organes. Cependant, en plus de l'étude des atteintes métaboliques, nous étudierons la distribution des polluants dans les différents organes afin de déterminer l'organe d'accumulation préférentiel. Par la suite, nous pourrions ainsi mettre en place, si nécessaire, une étude sur des lignées cellulaires ou des cultures primaires correspondant à cet organe cible. Sans cette étude préalable sur les animaux, il est impossible de faire un choix pertinent sur le modèle cellulaire à utiliser.

Les rats seront traités selon les règles éthiques de l'expérimentation animale. Le nombre de rats (4 groupes de 10 soit 40) a été évalué pour obtenir des résultats statistiquement exploitables selon des données analytiques des métabolites urinaires du BaP disponibles dans la littérature.

L'ensemble du projet est mené par un personnel compétent en expérimentation animale qui maîtrise parfaitement les gestes techniques nécessaires (gavage, prélèvements de sang). Du fait d'une alimentation riche en graisse avec une consistance ramollie, le milieu des animaux sera enrichie afin de pallier l'absence d'aliment à ronger. La surveillance des animaux est quotidienne suivant une grille de points limite pré-établie. De plus, un suivi minutieux des animaux sera réalisé à la moitié de l'expérience. Au-delà du non-respect d'un certain nombre de ces critères, les animaux seront considérés en souffrance et sortis du projet.

Tous les échantillons (organes, sang, urine) seront conservés pour des études ultérieures ayant pour but d'approfondir les mécanismes impliqués dans les effets observés sans avoir à utiliser des animaux supplémentaires.

10386 Toute lésion de l'organisme quelle qu'en soit l'origine, et en particulier le phénomène douloureux, s'accompagne d'une réaction de défense non spécifique : l'inflammation. Au cours de l'inflammation, une chronicisation de la douleur peut se développer. Le contexte postopératoire est particulièrement concerné par ces phénomènes puisqu'un nombre important de patients va développer des douleurs chroniques. C'est le cas par exemple dans la chirurgie du sein puisque près de 50% des patientes ont une persistance des douleurs à 2 ans.

Ce phénomène est le résultat d'une sensibilisation périphérique d'une part et centrale d'autre part. La sensibilisation périphérique a lieu au niveau de la zone douloureuse, là où la lésion a eu lieu alors que la sensibilisation centrale se fait au niveau de la moelle épinière et du cerveau. Plusieurs protéines intracellulaires vont être impliquées dans cette inflammation en répondant au stimulus extérieur (la douleur) et en activant d'autres protéines, conduisant à la sécrétion de petites protéines

appelées cytokines. Celles-ci vont ensuite entretenir cet état inflammatoire. Dans cette cascade inflammatoire, une protéine appelée p38 kinase (p38 MAPK) joue un rôle très important et conduit à la chronicisation de la douleur. Des inhibiteurs de cette p38 kinase sont en cours d'évaluation avec des applications dans plusieurs pathologies, y compris celles qui sont caractérisées par la douleur inflammatoire chronique. Ainsi, l'efficacité de plusieurs de ces inhibiteurs a été démontrée dans des modèles précliniques de douleur liée à une lésion nerveuse (neuropathique).

Notre projet de recherche a pour but d'évaluer l'effet d'un inhibiteur puissant et sélectif de la p38 appelé losmapimod. Ce dernier est actuellement en cours d'évaluation clinique chez des patients présentant des pathologies inflammatoires cardiaques ou pulmonaires (bronchite chronique ou infarctus du myocarde par exemple). De plus, il présente l'avantage d'être disponible par voie orale et d'être très bien toléré, c'est-à-dire qu'il présente très peu d'effets indésirables. Ainsi donc, si ce produit s'avère efficace pour le traitement de la douleur aiguë (objet de notre projet), il posséderait de nombreux avantages permettant de penser qu'il pourrait avoir un rôle futur en clinique humaine. Une étude antérieure a déjà montré que le losmapimod permet de diminuer la douleur (effet antalgique) et l'inflammation (effet anti-inflammatoire) dans un modèle de douleur aiguë inflammatoire périphérique.

Le but du travail envisagé est double :

1) quantifier l'effet antalgique et anti-inflammatoire du losmapimod dans le modèle de douleur aiguë inflammatoire périphérique provoquée par la carragénine. Afin de quantifier cet effet, nous souhaitons comparer le losmapimod à d'autres médicaments antalgiques et anti-inflammatoires disponibles en pratique clinique quotidienne. Ces comparaisons sont importantes et auront lieu au début de notre étude, car si dans nos premiers résultats, le losmapimod a un effet anti-inflammatoire et antalgique très modeste, inférieur aux antalgiques déjà disponibles, il ne sera pas licite de poursuivre les expérimentations. Nous souhaitons également comparer les effets antalgiques et anti-inflammatoires du losmapimod à ceux d'un autre inhibiteur de la p38.

2) étudier la pertinence de l'inhibition de la p38 MAPK dans deux autres modèles de douleur aiguë : douleur périphérique par incision plantaire et douleur neuropathique par ligature du nerf sciatique. Nous souhaitons également évaluer l'interaction entre l'inhibiteur de cette protéine et un autre antalgique utilisé dans les douleurs neuropathiques car nous pensons que les effets de ces deux molécules peuvent être synergiques et permettre de mieux traiter ces douleurs difficiles à soulager. Il n'est pas possible de remplacer l'expérimentation animale dans ce type d'étude, car la douleur est un phénomène complexe mettant en jeu plusieurs structures et plusieurs voies. Le modèle animal est une étape indispensable pour évaluer l'intégration in vivo de tous les circuits de la douleur. Son évaluation va passer par la réalisation de plusieurs tests comportementaux chez le rat, indispensables pour évaluer l'efficacité de la molécule testée dans les différents modèles de douleur.

Cependant, les stimuli utilisés provoquent une douleur transitoire et modérée. Ainsi la carragénine qui est un sucre d'origine naturelle entrant dans la composition de nombreux aliments, ne provoque pas de douleur au repos, mais seulement une hyperalgésie et une allodynie transitoires qui durent environ 2 à 3 jours avec une disparition totale en moins d'une semaine. L'allodynie correspond à une douleur provoquée par un stimulus non douloureux et l'hyperalgésie correspond à une diminution du seuil douloureux en réponse à un stimulus donné. L'incision plantaire et la ligature sciatique, effectuées sous anesthésie générale, correspondent respectivement à une douleur créée par la réalisation de points de suture et à une douleur d'une sciatique (hernie discale) chez l'homme. En cas de résultats positifs, une étude chez l'homme sera envisageable.

Les animaux seront hébergés en groupe dans de grandes cages avec des rouleaux et jouets. Des rats mâles adultes Sprague-Dawley provenant d'un élevage agréé seront utilisés et seront acclimatés pendant 10 jours par le même expérimentateur avec prise en main, caresses, installation pendant 30 minutes sur une plateforme grillagée une fois par jour. Des points limites sont prévus pour chacune des procédures. La réduction du nombre d'animaux nécessaire fera intervenir une analyse statistique optimale après un calcul de puissance. Nous avons estimé le nombre d'animaux nécessaires à 254 rats au maximum.

10387 L'obésité et le diabète de type 2 connaissent une progression significative et synchrone depuis 30 ans de sorte que la pandémie de « diabetes » actuellement observée au niveau mondial constitue un réel enjeu de santé publique. Des études récentes ont révélé que des neuropeptides connus pour jouer un rôle crucial dans le contrôle hypothalamique du comportement alimentaire sont aussi exprimés dans les îlots pancréatiques, suggérant que les neuropeptides hypothalamiques pourraient servir de lien entre l'homéostasie énergétique et glucidique, et constituer des cibles thérapeutiques potentielles pour le traitement de l'obésité associée au diabète de type 2.

Le 26RFa est un neuropeptide hypothalamique découvert par notre équipe, et qui a été identifié comme le ligand endogène d'un récepteur humain orphelin, le GPR103. Le 26RFa stimule fortement la prise alimentaire chez les rongeurs, et cette activité orexigène du neuropeptide est renforcée chez les animaux soumis à un régime riche en graisse. L'expression du 26RFa est augmentée chez les souris et rats obèses. L'ensemble de ces observations suggère que le 26RFa pourrait jouer un rôle important dans le développement et le maintien de l'obésité.

Des travaux récents, menés par notre équipe, ont révélé que les taux plasmatiques de 26RFa étaient corrélés au statut énergétique et pathologique des individus (obésité, diabète) et que sa sécrétion pourrait être régulée par le glucose ingéré. A l'appui de cette hypothèse, nous avons détecté la présence de quantités abondantes de 26RFa dans la paroi de l'estomac, du duodénum, du colon et de l'iléon. Nous avons aussi montré que le récepteur du 26RFa (GPR103) est exprimé par les cellules β . L'ensemble de ces observations suggère que le 26RFa pourrait être un nouvel acteur de la régulation de la glycémie. Il est donc important de comprendre le rôle joué par le 26RFa dans le maintien de l'homéostasie glucidique et d'établir si des dysfonctionnements de ce système peptidergique sont associés à l'obésité et au diabète de type 2 car ces recherches pourraient ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques dans le traitement de cette pathologie.

Dans ce contexte, nous souhaitons étudier le rôle du 26RFa dans la régulation centrale et périphérique de la glycémie chez des souris soumises à un régime riche en graisse (high fat : HF) de 3 mois qui les rend obèses et diabétiques. Ce projet s'articulera autour de deux axes principaux et complémentaires :

- d'une part, la caractérisation de la régulation de l'expression du 26RFa par les stimuli métaboliques et hormonaux aux niveaux périphérique et central chez des souris HF.
- d'autre part, l'analyse de l'effet du 26RFa sur la régulation de l'homéostasie glucidique en condition d'obésité et de diabète de type 2.

Seule l'utilisation d'un modèle mammifère intégré, donc in vivo chez l'animal entier, nous permettra de comprendre, de façon globale, la régulation et le rôle de ce neuropeptide et d'établir des comparaisons pertinentes avec les données que nous avons obtenues chez l'homme. Pour cela, la souris présente de nombreux avantages :

- ce modèle animal est largement utilisé pour les études de physiologie et physiopathologiques permettant une comparaison aisée de nos données avec celles d'autres équipes ;
- le modèle murin permet l'obtention de lignées génétiquement modifiées, nécessaires pour comprendre l'implication de facteurs précis dans des processus physiologiques et physiopathologiques. Ainsi, nous disposons depuis peu d'une lignée de souris invalidée pour le gène du 26RFa (lignée 26RFa-KO) qui sera un atout majeur pour comprendre le rôle du 26RFa dans la régulation de l'homéostasie glucidique ;
- la souris est facilement élevée en animalerie : taille et coûts d'entretien réduits, fortes performances reproductives.

La réalisation de l'ensemble de ce projet nécessitera l'utilisation de 783 souris mâles dont 735 seront issues de la lignée C57Bl/6J et dédiées à l'étude du rôle du 26RFa dans la régulation centrale et périphérique de la glycémie. 48 souris mâles seront issues de la lignée 26RFa-KO et permettront d'évaluer l'effet de l'absence de 26RFa sur la régulation de l'homéostasie glucidique en condition d'obésité associée au diabète de type 2. L'ensemble des effectifs seront détaillés par la suite, pour chaque procédure mise en œuvre et résumés sous forme de tableau en annexe 1.

Au cours de ce projet, nous appliquerons la règle des 3 R afin de limiter le nombre d'animaux utilisés. Ainsi, les processus physiologiques étudiés seront analysés sur des lots de 12 souris par condition de traitement. Ces effectifs nous assureront d'obtenir des données statistiquement analysables. L'effectif des groupes d'animaux pourra être diminué à 10 lors des études concernant la régulation

du 26RFa tout en conservant des données statistiquement fiables. De plus, les procédures, n'impliquant pas d'effet néfaste à long terme, pourront être menées successivement sur les mêmes animaux, intercalées avec des périodes de repos au cours desquelles les paramètres physiologiques et le bien-être des souris seront régulièrement évalués.

En outre, les conditions d'élevage et de manipulation des animaux seront raffinées pour réduire au maximum leur souffrance éventuelle. Ainsi, dans le cas de procédures ayant un impact sévère sur l'animal des mesures permettant de palier le handicap généré seront mises en place. Par exemple, l'ensemble des actes pouvant entraîner une douleur sera réalisé sous anesthésie (locale ou générale) et la douleur au réveil sera traitée par des analgésiques. C'est notamment le cas lors de l'implantation de canules en i.c.v. après laquelle les souris seront étroitement surveillées pour prévenir l'apparition de tout signe de mal-être.

Enfin, certaines procédures nécessitant des prélèvements sanguins importants (OGTT, ivGTT...) ou le prélèvement de structures (explants hypothalamiques et analyse de l'expression hypothalamique de 26RFa) sont classées sans réveil pour éviter de causer des dommages trop importants aux animaux maintenus en vie.

10388 Le diabète de type 1 touche à l'échelle mondiale un nombre croissant de patients et constitue une véritable épidémie. Si de nouvelles approches thérapeutiques tendent à rendre les traitements plus physiologiques (transplantation de pancréas, d'îlots pancréatiques), celui prescrit en premier intention reste l'injection pluriquotidienne d'insuline d'origine exogène. Celle-ci est administrée la plupart du temps à l'aide de stylos injecteur ou de pompes externes permettant de délivrer des doses adaptées à chaque patient. L'un des points communs à ces différents modes d'administration est l'utilisation de la voie sous-cutanée, la plus facile d'accès pour le patient.

Cependant, le lit vasculaire présent au niveau sous-cutané n'est pas directement connecté au système porte du foie. Il en résulte une absence de premier passage hépatique de l'insuline injectée, comme c'est le cas lors de la sécrétion de l'hormone par le pancréas. L'efficacité biologique en est affectée et de nombreux cas d'insulino-résistance sont relevées, compliquant la prise en charge du patient. Des modes d'administration à l'aide de cathéters en intra-péritonéal sont déjà sur le marché mais présentent des risques de complication non négligeables : infections, adhérences provoquant l'obstruction du cathéter. C'est pourquoi, un autre site est évoqué : l'extra-péritoine, correspondant à l'espace entre le péritoine et les muscles abdominaux. Il présenterait l'avantage de permettre un premier passage hépatique de l'insuline, sans être au contact direct des viscères, permettant ainsi de prévenir les problèmes d'adhésion tissulaire. Il s'agirait ainsi d'un site prometteur pour la mise en place de cathéter ou d'autres dispositifs de délivrance d'insuline.

Ce projet a pour but de démontrer l'intérêt d'une délivrance extra-péritonéale d'insuline par infusion chez un modèle de rat diabétique. Cette étude nécessitera 123 animaux au total. 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. Le principe de réduction est ici appliqué en utilisant un nombre minimum d'animaux qui reste suffisant pour l'obtention de résultats statistiques. Ce nombre tient compte des pertes éventuelles liées aux implantations de cathéters ou de la pompe électronique implantable délivrant de l'insuline. Enfin, étant donné que nous souhaitons évaluer l'activité biologique de l'insuline au niveau extrapéritonéal, nous ne pouvons nous soustraire de l'étude in vivo.

10389 L'évaluation des interactions possibles et des effets secondaires potentiels des dispositifs médicaux mis en contact avec le corps humain (Biocompatibilité) est exigée par les autorités réglementaires. Le but de ce projet est de tester la biocompatibilité d'implants dentaires destinés à l'homme après implantation chez le chien qui est une des espèces recommandées et la plus utilisée pour ce genre de test. A ce jour, aucun modèle in vitro ni méthode alternative ne permet d'étudier la biocompatibilité après implantation. Il est donc indispensable de recourir à l'animal entier pour étudier ce phénomène

Avant de pouvoir d'implanter ces biomatériaux, il est nécessaire de pratiquer une extraction dentaire sous anesthésie générale afin de préparer les sites d'implantations. Trois mois après cette extraction et après avoir vérifié la cicatrisation complète des sites, ces implants dentaires seront placés sous anesthésie générale. Un suivi des animaux (examen clinique, buccodentaire, radiographique) sera ensuite réalisé sur plusieurs semaines. Les animaux seront euthanasiés à différents intervalles de temps et le site d'implantation sera prélevé dans le but d'effectuer un examen histologique pour évaluer la biocompatibilité (réactions des tissus aux niveau des implants) Au maximum pour ce projet, nous prévoyons de réaliser 4 études par ans soit 20 études par espèces en 5 ans.

Le nombre d'animaux sera toujours réduit au minimum et sera compris entre 4 à 8 animaux en tenant compte de la variabilité des résultats attendus.

Au total, au maximum 120 chiens pourront être utilisés en 5 ans dans ce projet.

Une évaluation éthique préalable sera faite pour chaque étude.

Durant toute la phase expérimentale, les animaux seront hébergés en groupe. Toute intervention sur l'animal sera effectuée par une personne habilitée et expérimentée afin de réduire au minimum le stress. L'extraction dentaire et l'implantation des dispositifs seront réalisées par des chirurgiens expérimentés sous anesthésie générale, un traitement antalgique post opératoire adapté sera administré aux animaux.

10390 Projet :

Les cellules cancéreuses se distinguent des cellules normales par l'accumulation de mutations dans leur génome. Ce phénomène est plus au moins important selon le type de tumeurs. Nous sommes intéressés à l'étude du cancer du côlon de type MSI (pour Microsatellite instable). Ces cancers surviennent à la suite de l'inactivation du système de réparation de l'ADN appelé MMR, normalement responsable de la réparation des erreurs produites pendant la réplication de l'ADN. Il est à noter que le cancer est une maladie multifactorielle en raison des nombreux facteurs génétiques, hormonaux, environnementaux, qui peuvent concourir à son déclenchement et multiphasique puisque le développement de la maladie est un phénomène prolongé dans le temps et pouvant comporter plusieurs étapes.

L'objectif de ce projet est d'étudier les conséquences de l'inactivation du système MMR spécifiquement dans l'épithélium colique et l'influence d'un régime riche en graisse sur le développement tumoral colique de type MSI. Ceci nous permettra d'avoir un modèle d'étude physiopathologique plus adapté et proche de l'homme.

Nombre/Type d'animaux :

Ce projet impliquera l'utilisation de 120 souris transgéniques pour une durée de 5 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment. Il repose sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Les questions scientifiques posées au sein de ce projet ne peuvent être abordées qu'à travers l'étude d'organisme vivant dans leur ensemble. Le nombre d'animaux requis a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

Remplacement : Un système vivant est nécessaire pour étudier les acteurs mis en jeu dans le développement tumoral qui est au cœur de ce projet. Il n'est pas possible de recréer in vitro la complexité d'un organisme entier avec tous les acteurs cellulaires rentrant en jeu.

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

Raffinement : Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des procédures a été mis au point afin de permettre une interprétation fiable dans le respect du bien-être animal. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation, les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum. Le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification ou de maison de type igloo. Nous nous efforçons à chaque instant de raffiner nos procédures afin de garantir le bien-être des animaux en cours de procédure grâce à une surveillance attentive (points limites) et des soins adaptés.

10391 La sclérose en plaque est une maladie Chronique dégénérative du système nerveux central qui touche 100 000 personnes en France, 2,5 Millions dans le monde. C'est donc un enjeu médical majeur.

Ce projet rentre dans le cadre d'un projet plus global dans le but de développer des molécules à potentiel thérapeutique contre les maladies neurodégénératives et de les amener jusqu' aux essais cliniques (chez l'Humain).

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 cellulaire protecteur 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 chaîne de développement des candidats-médicaments.

Que ce soit 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 se lancer dans une telle aventure sans résultats validés 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'y recourir (du fait de tous les freins qui limitent l'approvisionnement en échantillons humains).

Nous avons également choisi des modèles dont les résultats pourront servir pour valider l'efficacité des molécules dans d'autres pathologie que la SEP (Notamment la Sclérose Latérale Amyotrophique et les maladies inflammatoires), ce qui permettra de limiter là encore le recours à l'animal.

Par ailleurs les molécules testées dans ce modèle ont déjà été présélectionnées dans un autre modèle in vivo de maladie neurodégénérative (Parkinson)

Les modèles animaux de la maladie permettent de valider l'efficacité des molécules dans un organisme entier et d'affiner certaines interrogations comme la posologie et 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 de molécules nouvelles dans le cadre de la sclérose en plaque.

La pathologie sera modélisée chez les souris.

Un total maximal de 720 souris seront utilisées sur 5 ans.

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 tout en permettant de générer des données statistiques solides; des études statistiques basées sur les résultats d'autres équipes de recherche nous permettent de prédire le nombre d'animaux suffisant pour obtenir les réponses à nos interrogations.

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 permettront de nous placer dans les conditions optimales. Des points limites sont définis pour éviter toute souffrance potentielle.

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.

10392 Au-delà des fonctions énergétiques de l'ATP, cette molécule joue également un rôle physiologique fondamental en tant que messenger extracellulaire permettant aux cellules et aux tissus de communiquer les uns avec les autres. Bien que l'ATP puisse être libérée dans des conditions physiologiques par des mécanismes non lytiques, il peut également l'être suite à une nécrose cellulaire conditionnée par un choc traumatique, des lésions d'organes ou un développement tumoral. La présence d'ATP extracellulaire, au contact de cellules cancéreuses, peut alors entraîner leur mort et ainsi contrôler la progression tumorale. Les progrès de l'immunothérapie ont récemment levé un voile supplémentaire sur le rôle de l'ATP dans l'inhibition de la croissance tumorale. En effet, l'ATP, en plus d'agir directement sur les cellules cancéreuses, exerce également une attraction sur les cellules du système immunitaire qui viennent alors lysé les cellules tumorales. Dans ce projet, notre objectif est donc de caractériser de nouvelles stratégies thérapeutiques capables d'accroître la concentration dans la tumeur de l'ATP extracellulaire afin d'augmenter l'efficacité des immunothérapies. Notre approche repose sur l'utilisation de petites molécules qui, contrairement, aux anticorps thérapeutiques, montrent, en raison de leur taille, une meilleure diffusion au cœur de la tumeur et représentent un coût financier limité pour la communauté. Dans ce projet, nous mettons tout en œuvre pour respecter la règle des 3R : Réduction, Raffinement, Remplacement, en utilisant la quantité minimale de souris pour obtenir au final des résultats statistiquement significatifs. Les règles éthiques seront toujours respectées au cours de notre protocole et nous veillerons à surveiller les points limites que nous nous sommes fixés. A la fin de l'étude expérimentale, les animaux seront euthanasiés et les tumeurs prélevées pour poursuivre nos recherches sur l'action de nos molécules au niveau de l'infiltration tumorale des cellules du système immunitaire au sein des tumeurs prélevées. Au total, ce protocole nécessitera un effectif maximum de 954 souris sur une durée de 5 années.

Remplacement : Des études *in vivo* déjà menées sur des souris immunodéficientes 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. Néanmoins, l'étude de l'infiltration des cellules du système immunitaire ne peut être conduite qu'*in vivo* sur des modèles de souris immunocompétentes. Pour cela, nous avons choisi des modèles syngéniques de tumeurs au profil de réponse variable à l'immunothérapie afin d'évaluer l'effet de nos molécules sur l'infiltration des cellules du système immunitaire et l'intérêt de les combiner aux immunothérapies aujourd'hui utilisées. Aujourd'hui, il n'existe pas de modèles alternatifs au modèle animal proposé ici qui est le seul capable de recréer l'ensemble des acteurs impliqués dans le développement tumoral et l'action des traitements étudiés.

Réduction : Nous limitons au maximum le nombre d'animaux par groupe de façon à obtenir des résultats statistiquement fiables. La taille des groupes a été déterminée sur la base du calcul de puissance tiré d'études similaires menées dans le passé sur des souris « nude ». A cause des variabilités inter-animales et intergroupes, un nombre trop restreint d'animaux engendrerait néanmoins des résultats trop variables et non valides. Le nombre de souris que nous avons déterminé nous permettra ainsi d'avoir suffisamment d'animaux pour avoir des statistiques significatives à la fin du protocole ce qui nous évitera de répéter l'étude. Par ailleurs, de précédentes études réalisées nous permettent de connaître le nombre de cellules à injecter afin de réduire le nombre d'animaux. Enfin, les données biologiques (croissance tumorale, infiltration) mesurées lors des premières expériences, permettront d'ajuster nos calculs de puissance et d'adapter au plus juste le nombre d'animaux pour les procédures suivantes.

Raffinement : 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, 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.

10393 1. Objectif scientifique du projet

TLR3 est un récepteur de l'immunité innée présent dans la plupart des cellules immunitaires et épithéliales.

Dans les cellules cancéreuses qui expriment toujours le récepteur (cancer du sein, cancer du poumon, etc.), 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 récemment.

L'objectif de ces expériences est de d'étudier la tolérance et la pharmacocinétique in vivo.

2- Retombées attendues dans le domaine de la cancérologie

Le projet a pour but de développer une nouvelle molécule pro-apoptotique et immunothérapeutique ciblant les cancers épithéliaux TLR3. Ces résultats s'inscrivent dans le cadre du développement d'une application thérapeutique utilisable chez les patients.

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

La règle des 3R (réduire, raffiner, remplacer) sera respecter ; Réduction du nombre d'animaux, sans mettre en péril une interprétation statistique des résultats. Une définition précise des points limites et une surveillance adaptée des animaux permettra d'éviter la souffrance des animaux.

Raffinement : Une définition précise des points limites et une surveillance adaptée des animaux minimum 3 fois par semaine, permettra d'éviter la souffrance des animaux. De plus tous les gestes pouvant provoquer un stress ou de la souffrance chez l'animal, seront réalisés sous anesthésie. Ces procédures ne requièrent pas l'usage d'analgésique. Remplacement : lors de la réalisation des protocoles, le maximum d'informations sera récolté afin de restreindre l'utilisation de l'animal.

4- Nombre total d'animaux inclus dans ce projet

Une première expérience avec 20 souris sera réalisée, suivi d'une seconde expérience comportant 130 souris,

Au total, 150 souris seront incluses dans ce projet pendant les 3 ans à venir.

Le projet fait suite à des études en culture ayant démontré l'induction de l'apoptose dans les lignées tumorales suite à une incubation avec ce ligand.

Seul un modèle in vivo permettra d'étudier la tolérance et la pharmacocinétique de cette molécule.

10394 1-Objectif scientifique du projet :

Il est généralement admis qu'une meilleure définition des mécanismes cellulaires et moléculaires du développement et de l'homéostasie de l'épithélium intestinal aide à mieux caractériser les altérations dans les cancers. Dans ce contexte les cellules souches des cryptes intestinales constituent les cellules responsables du maintien de ce tissu et sont également le contingent cellulaire impliqué dans les premiers événements de la transformation cellulaire et de la tumorigenèse intestinale.

La souris (*Mus musculus*), dans des fonds génétiques sauvages ou génétiquement modifiés, est très largement utilisée comme animal modèle pour des études fondamentales et des études à fins translationnelles dans le domaine de la cancérologie. Dans ce dernier cas, le but est de reproduire chez l'animal les étapes du développement et de la progression des cancers, en présence ou en l'absence d'inflammation, pour des analyses fines. En effet, les animaux peuvent être utilisés pour les approches de physio-pathologie intégrative de l'intestin in vivo ou pour des études cellulaires et moléculaires ex vivo.

2- Retombées attendues dans le domaine de la cancérologie

Au-delà de l'intérêt cognitif des mécanismes de contrôle de l'homéostasie de l'épithélium intestinal et d'une meilleure appréhension des conséquences de la dérégulation des voies impliquées dans le cancer, le projet vise :

- à étudier des réseaux signalétiques dans la plasticité des cellules souches, la résistance aux traitements et les problèmes de récurrence associés;

- à tester des nouvelles cibles thérapeutiques dans des modèles animaux de cancers colorectaux développés sur un contexte inflammatoire, héréditaire ou sporadique.

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

Le projet prend en compte les recommandations du législateur concernant l'application de la démarche 3R.

- Réduire : en bonne condition d'élevage et en utilisant des procédures bien standardisées il est possible d'utiliser un nombre minimal de souris requis par condition expérimentale pour obtenir des résultats statistiquement exploitables.

- Raffiner : Une surveillance journalière des animaux sera effectuée afin de déterminer toute douleur ou souffrance éventuelle qui sera prise en charge le cas échéant et des points limites pertinents.

- Remplacer : l'utilisation de cultures primaires pour des études mécanistiques permet de réduire le nombre d'animaux pour l'expérimentation.

4- Nombre total d'animaux inclus dans ce projet : 522

10395 Chaque étude de ce projet a pour but d'évaluer les effets bénéfiques de candidats-médicaments dans un modèle animal mimant certains aspects du syndrome de stress post-traumatique, syndrome rencontré chez l'homme suite à des événements traumatiques majeurs (soldats revenants de conflits, agressions ...). Pour cela, au cours de chaque étude, des souris seront soumises à un stress (par une courte mise en contact avec leur prédateur naturel, le rat), puis leur comportement locomoteur, leur performance mnésique et leur anxiété pourront être évalués jusqu'à 7 jours après le stress. Le candidat médicament sera en général administré après le stress (pour mimer la situation clinique), l'objectif étant de détecter des molécules permettant de réduire l'état anxieux des souris.

A la fin de chaque étude, des prélèvements de sang ou de tissus pourront être effectués.

Pour ce projet, il est prévu un nombre maximal de 2625 animaux sur 5 ans.

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

Remplacement : dans le cadre du développement de nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez la souris et 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 l'anxiété. 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 et le rat sont les espèces qui sont 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
- . Le suivi d'éventuels signes cliniques
- . La détermination des points limites
- . Le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire.

10396 L'objectif principal du projet est d'évaluer les relations entre croissance et consommation alimentaire, avec pour but principal d'améliorer la méthode de mesure de l'efficacité alimentaire individuelle chez le bar *Dicentrarchus labrax*.

L'efficacité alimentaire (rapport entre la croissance et la quantité d'aliment ingérée par chaque poisson) est un caractère essentiel à la fois pour améliorer l'efficacité économique des élevages et pour réduire leur impact environnemental (moins de ressources consommées, moins de déchets excrétés pour un même niveau de production). L'amélioration génétique de l'efficacité alimentaire existe chez les espèces terrestres, mais très peu de travaux ont été réalisés chez les poissons car

il est extrêmement complexe de mesurer la consommation alimentaire individuelle des poissons élevés en groupe ou de fixer une ration individu par individu dans un groupe.

Actuellement, l'une des méthodes les plus simples pour mesurer l'efficacité alimentaire des poissons est de les élever en aquariums isolés et de mesurer la croissance des poissons en fonction de la ration alimentaire donnée. Cette ration est généralement calculée pour être en deçà de l'optimum, ce qui permet de faciliter l'expérimentation. Cependant, il n'a pas été mis en évidence jusqu'à présent l'impact d'une telle restriction sur les estimations d'efficacité alimentaire chez le poisson. Il est donc nécessaire de mieux comprendre les relations entre croissance et consommation alimentaire des poissons au niveau individuel.

Le projet comportera 3 grandes étapes : - Etape 1 : évaluation de la ration optimale individuelle (ad-libitum volontaire) de chaque poisson – Etape 2 : mesure de l'efficacité alimentaire individuelle en utilisant la ration ad-libitum volontaire de chaque poisson – Etape 3 : évaluation de l'efficacité alimentaire individuelle avec une alimentation restreinte.

L'ensemble des trois étapes sera réalisé sur un total de 200 poissons élevés en aquariums isolés, permettant une estimation précise et fiable des relations entre toutes les mesures. 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). La mise au point d'une méthode fiable d'évaluation de l'efficacité alimentaire, objet du présent projet, pourrait permettre une sélection plus efficace en disposant d'un critère de mesure plus précis.

Pour réduire la souffrance et l'angoisse, les animaux sont manipulés uniquement sous anesthésie pour toutes les mesures individuelles et sont disposés dans des aquariums leur permettant un contact visuel avec des congénères (Raffinement).

Dans l'objectif d'optimiser l'utilisation d'animaux vivants, d'autres mesures seront réalisées dans le cadre de ce projet dans l'objectif de trouver un critère fortement corrélé avec l'efficacité alimentaire des poissons. Pour cela, les poissons seront filmés pendant toute l'expérimentation et des mesures d'activité physique seront réalisées par analyse des films. D'autre part, des mesures de cortisol excrété dans l'eau par les poissons seront réalisées. Le taux de cortisol des poissons permet de quantifier leur stress, sachant qu'il existe une corrélation forte entre sa valeur plasmatique et l'efficacité alimentaire chez le poisson chat *Clarias gariepinus*. Le choix de mesurer le cortisol dans l'eau des aquariums d'élevage plutôt que dans le sang des poissons a été fait pour réduire le stress et la douleur des poissons (Raffinement).

Ce protocole ne comporte pas de Remplacement, car il est nécessaire de faire des mesures directement sur les poissons pour l'instant.

10397 L'inflammation est une réponse physiologique du système immunitaire dont l'intensité et/ou la durée anormales peuvent conduire à la mise en place de désordres physiopathologiques (maladies inflammatoires intestinales, inflammation de faible intensité dans l'obésité et autres maladies métaboliques par exemple).

Le but de cette étude est de tester la capacité de différents extraits végétaux (développés par un partenaire industriel) à moduler la réponse à un stress inflammatoire aigu.

Pour ce faire, nous utiliserons des souris âgées de 8 semaines que nous soumettrons à une stimulation du système immunitaire par injection de lipopolysaccharide (LPS, une endotoxine bactérienne) après gavage pendant 6 jours consécutifs avec un extrait végétal de composition confidentielle. Les animaux seront euthanasiés quatre heures plus tard, après prélèvement du sang intracardiaque sous anesthésie générale, et différents organes seront prélevés afin de mesurer des marqueurs inflammatoires et étudier les mécanismes moléculaires mis en jeu.

Au total, le projet nécessitera l'utilisation de 80 souris C57Bl6/J.

Cette étude prendra en compte la règle des 3 Rs :

Remplacement : il n'existe à l'heure actuelle aucune méthode de substitution in vitro pour étudier l'impact d'extraits végétaux sur la réponse inflammatoire centrale et périphérique. La souris est un modèle de choix car elle présente des mécanismes physiologiques proches de ceux qui sont observés chez l'être humain.

Réduction : le nombre d'animaux est le minimum nécessaire pour mettre en évidence des différences statistiquement significatives entre les groupes et pour chaque individu nous étudierons l'effet au niveau de plusieurs tissus.

Raffinement : Le prélèvement sanguin est peu douloureux et il est prévu d'utiliser de la lidocaïne/prilocaine 5% de façon préventive. L'environnement sera enrichi par la présence d'un igloo en plastique et de nid végétal et les animaux seront hébergés par groupe de 4 individus.

10398 Les troubles du développement sexuel (TDS) constituent un groupe important de maladies humaines avec plus d'un enfant sur 300 ayant des symptômes tels que les cryptorchidies et un sur 4000 présentant une inversion de sexe. Cependant les mécanismes conduisant aux TDS restent inexpliqués dans plus de 50% des cas.

Chez l'embryon XY (garçon), la gonade se différencie en testicule qui synthétise des androgènes. Ces hormones sont nécessaires à la différenciation de l'appareil génital en épидидyme, canaux déférents, vésicules séminales, prostate et pénis. Chez l'embryon XX (fille), les voies génitales se différencient en oviducte, utérus, vagin et clitoris. L'inversion de sexe de l'enfant est diagnostiquée suivant une divergence entre la morphologie de l'appareil génital et le sexe chromosomique (XY ou XX). Cette pathologie peut résulter d'un dérèglement hormonal tel qu'une absence d'androgènes chez un individu XY ou un excès chez un individu XX. L'effet des dérégulations hormonales sur le développement des voies génitales a été étudié mais l'effet de ces dérégulations dans le devenir de la gonade n'a été pas rapporté. Notre projet vise à clarifier le rôle des hormones dans le développement de la gonade normale et pathologique. Anticiper le devenir de la gonade est un prérequis pour établir des traitements adéquates pour ces pathologies.

Dans un souci de se conformer à la règle des 3R (remplacer, réduire, raffiner), des techniques de culture de gonades ont été testées mais ont donné des résultats non conclusifs dus à des problèmes de dégénérescence des tissus. De ce fait, nos analyses doivent être réalisées sur des gonades in vivo en utilisant des souris génétiquement modifiées. A l'heure actuelle, il n'existe pas de système permettant de remplacer l'utilisation des souris pour notre recherche mais nous exerçons une veille bibliographique pour effectuer ce remplacement quand il deviendra possible. Le modèle utilisé est un modèle d'inversion de sexe, c'est-à-dire des souris mâles XX. Il est important de noter que l'inversion sexuelle n'est pas un phénotype dommageable.

Dans une perspective de réduire le nombre de souris utilisées, 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. De plus, plusieurs analyses seront effectuées sur les mêmes échantillons afin de limiter le nombre d'animaux requis.

En ce qui concerne le raffinement, les souris recevront un traitement hormonal (hormones ou antagonistes d'hormones) en injection sous-cutanée ou gavage oral. Les traitements utilisés ont déjà été expérimentés chez la souris. Le protocole a été établi par allier traitement et minimisation des effets secondaires potentiels. L'injection sous-cutanée peut engendrer une douleur modérée. 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. Pour réaliser ce projet nous utiliserons 522 souris/foetus.

10399 L'épilepsie du lobe temporale concerne 250000 enfants en France et constitue la forme d'épilepsie la plus fréquente et la plus résistante au traitement anti-épileptique chez l'enfant. Elle est souvent associée à une restructuration cérébrale, faisant suite à un épisode initial de crise d'épilepsie prolongée (état de mal épileptique). Le processus de réarrangement favorise alors l'apparition de crises convulsives, plusieurs mois ou années plus tard. Il est donc nécessaire de bloquer ce processus pour lutter contre l'évolution de cette maladie.

Connu depuis un siècle, le régime céto-gène bénéficie d'un regain d'intérêt depuis le milieu des années 1990, en pratique clinique et dans les travaux de recherche en épilepsie. Il consiste en une modification de l'alimentation par réduction de l'apport quotidien en sucres, remplacés par des protéines et des lipides. Il existe différentes formes de régime céto-gène, qui varient en fonction des

ratios des apports en lipides versus protéines + glucides. Le ratio 4 : 1 est le plus couramment utilisé. On utilise depuis plusieurs années des formulations sous forme de poudres à reconstituer avec de l'eau. En France, il s'agit du Ketocal®.

A ce jour, bien que plus de 10 nouveaux médicaments antiépileptiques aient été développés au cours des deux dernières décennies, ces traitements ont essentiellement amélioré la qualité de vie des patients mais n'ont pas démontré d'effet neuroprotecteur ou anti-épileptogène (réduire ou bloquer l'apparition d'une épilepsie chronique). Les nouvelles thérapeutiques à envisager aujourd'hui devraient avoir pour objectif d'une part, d'empêcher les crises d'épilepsie et d'autre part, d'empêcher la survenue d'une épilepsie chronique après une agression cérébrale initiale dans l'enfance. De plus, dans le cas de l'épilepsie chronique pharmacorésistante, la thérapie neuroprotectrice à envisager doit être acceptable pour le patient pendant une longue période avec peu d'effets indésirables. Le régime céto-gène pourrait donc correspondre à ces caractéristiques.

Dans cette étude, nous proposons donc de réaliser une étude expérimentale chez le rat de la souche Sprague Dawley au nombre de 48 animaux.

L'état de mal (première crise épileptique) est induit par un agent pro-convulsivant : la pilocarpine.

En comparant les caractéristiques de l'épilepsie après cette agression chez des animaux traités ou non par l'administration d'un régime céto-gène nous pourrions en déterminer l'effet anti-épileptogène et neuroprotecteur.

La comparaison des caractéristiques anatomiques des cerveaux des animaux en imagerie par résonance magnétique (IRM) et la comparaison des dommages sur les tissus cérébraux notamment grâce à des imageries réalisées au moyen de marqueurs radioactifs permettront de mieux comprendre les mécanismes de la neuroprotection (PET-scan).

Les objectifs de cette étude expérimentale sont :

1/ Evaluer les modifications du métabolisme régional cérébral induites par le régime céto-gène chez le rat sain,

2/ Evaluer le potentiel neuroprotecteur et anti-épileptogène de ce régime, dans le modèle d'épilepsie induite lithium-pilocarpine chez le rat.

(1) Nous disposons d'un modèle validé d'épilepsie pharmacorésistante induite par l'injection d'un agent pro-convulsivant : la pilocarpine et qui reproduit les caractéristiques cliniques principales de l'épilepsie temporelle chez l'Homme.

(2) En comparant les caractéristiques de l'épilepsie après cette agression chez des animaux traités ou non par le régime céto-gène, nous pourrions en déterminer l'effet anti-épileptogène et neuroprotecteur. Cette comparaison sera réalisée grâce à des techniques d'imagerie permettant d'effectuer des études longitudinales utilisant un nombre réduit d'animaux (Réduction).

(3) L'analyse objective des caractéristiques métaboliques des cerveaux ne peut être réalisée que sur un modèle animal reproduisant les mêmes caractéristiques que chez l'Homme afin d'être au plus près du patient (absence de Remplacement).

(4) Cette étude sera menée selon les bonnes pratiques de laboratoire pour limiter le nombre d'animaux utilisés et limiter leur souffrance : Une surveillance quotidienne et soutenue des animaux est mise en place (surveillance en continu 12h par jour durant 72h); Leur poids sera mesuré tous les jours, jusqu'à la disparition des symptômes cliniques des convulsions; 2 doses de myorelaxant leur sera administré le 1er jour pour réduire les contractures musculaires; Une consommation de glucides lents et d'eau sera administrée durant les 3 premiers jours par nos manipulateurs (dispositif de nursing imaginé comme en néonatalogie avec des dispositifs de biberons avec des céréales chocolatés ou de la poudre kétocal) (Raffinement).

Points limites : Un contrôle de l'absence de signe de douleur, de stress et d'anxiété, d'une cachexie, d'un arrêt de prise d'aliment/de boisson (au-delà de 24h), piloérection associée à une perte de poids dépassant 20% en 48h, de la récurrence des convulsions et d'une immobilité, sera effectué quotidiennement tout au long de l'étude. Les animaux ne répondant pas à ces critères, les animaux présentant des crises d'épilepsie récurrentes toutes les 2 heures, et/ou les animaux dont la perte de poids dépasse 20% en 48h, seront exclus de l'étude. Pour ces rats une prise alimentaire enrichie en glucides lents est administrée en continu avec un nursing plus renforcé; si au bout de 48h l'animal, présente toujours des signes de souffrance, il sera mis à mort pour abréger ses souffrances.

10400 Au cours d'une infection l'activation de senseurs de l'immunité innée, dont les inflammasomes, donne lieu au déclenchement d'une réponse inflammatoire permettant de combattre et de stopper l'infection. Cependant, l'inflammation mal contrôlée peut devenir délétère pouvant aller jusqu'à la mort du patient. 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, ainsi que dans des pathologies autoinflammatoires. Le lipopolysaccharide (LPS, également appelé endotoxine) est un des composants de la paroi de certaines bactéries. L'injection intrapéritonéale de LPS induit l'activation de la voie des inflammasomes et provoque ainsi une inflammation systémique. Ce modèle nommé choc endotoxique constitue un modèle de choix pour l'étude de la voie des inflammasomes in vivo. En raison des interactions complexes entre les différentes cellules et tissus dans ce processus, des modèles in vivo restent un moyen irremplaçable pour étudier les inflammasomes.

Ce projet vise donc à évaluer l'impact in vivo de différents régulateurs supposés des inflammasomes. Pour cela, la réponse au choc endotoxique de plusieurs lignées transgéniques pour des régulateurs des inflammasomes sera comparée avec celle de souris non modifiées génétiquement. Ce projet pour être mené à bien nécessitera l'utilisation de 630 souris au maximum. Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des expérimentations ont été mises au point avec des points limites suffisamment prédictifs pour respecter les exigences de remplacement, réduction et raffinement et ainsi permettre une interprétation fiable des résultats dans le respect du bien-être animal, les études in vitro ne nous permettant pas de reproduire les mécanismes de l'inflammation étudiés dans ce projet.

10401 Parmi les trois lois que Newton formule pour décrire les propriétés fondamentales d'un objet physique, la deuxième établit le principe dynamique : l'accélération d'un objet est proportionnelle à la résultante des forces extérieures qui agissent sur lui, et inversement proportionnelle à sa masse. Ainsi, les variations de pression artérielle sont dues au « poids » que le sang acquiert en fonction de l'accélération subie dans les trois plans de l'espace.

Chez les malades en état de choc, il n'existe aucune donnée relative à l'impact des variations cinétiques sur les paramètres hémodynamiques.

Sans aucune explication formelle apportée par une méta-analyse récente, le transport d'un patient grave par hélicoptère lui assure une meilleure survie. Les raisons sont nombreuses, notamment aux États-Unis, où l'hélicoptère assure aux blessés les plus graves des soins médicaux dès la phase pré-hospitalière et un transfert rapide vers un centre de référence en traumatologie. Mais les variations cinétiques, plus importantes par voie routière, sont-elles indépendamment un critère péjoratif de survie des patients en état de choc hémorragique ? Le but de ce travail, jamais réalisé à notre connaissance, est de vérifier l'impact du transport sur des sujets en choc hypovolémiques. 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 mise en situation complexe, la totalité des paramètres modélisables l'ayant été par une analyse de la littérature, de données parcellaires obtenues en situation réelle humaine et surtout de mesures physiques lors de déplacement d'ambulance vides. Le modèle animal de grande taille permettra, dans des conditions identiques à la pratique humaine, de combiner un très grand nombre de données physiologiques et cinétiques.

- Il s'agit de procédures pour lesquelles une anesthésie et une analgésie profondes et 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.).

- Le nombre total d'animaux a été limité à 10 qui est le minimum pour obtenir des données significatives.

10402 Actuellement, la mobilisation des défenses immunitaires d'un patient contre sa maladie (immunothérapie) représente une thérapie prometteuse pour le traitement du cancer chez l'homme

avec des très bons résultats obtenus dans des essais cliniques. Ce projet vise à raffiner les mécanismes d'action de nouvelles molécules immuno-thérapeutiques anti-cancéreuses de façon à accélérer leur programme de développement préclinique et leur entrée en phase clinique. Ces molécules sont principalement des anticorps qui ciblent des molécules inhibitrices qui empêchent les cellules immunitaires (lymphocytes T) d'éliminer les cellules tumorales. Pour aboutir à la caractérisation des mécanismes d'action nous utiliserons des modèles animaux (souris) pour induire des réponses immunitaires au niveau des nœuds lymphatiques et suivre l'impact de ces anticorps sur la fonction des cellules immunitaires résidentes. Plus précisément, nous induirons la réponse des lymphocytes T chez l'animal grâce au transfert sous-cutané de cellules immunitaires (cellules dendritiques) présentatrices d'antigènes tumoraux. En suite ces animaux seront traités par voie intraveineuse avec des molécules immuno-thérapeutiques pour étudier la capacité de ces molécules à induire ou pas une réponse accrue des lymphocytes T. Certains animaux seront soumis à une greffe de moelle osseuse de façon à pouvoir identifier le rôle du système hématopoïétique dans la réponse aux molécules immuno-thérapeutiques. D'autres seront soumis à des procédures microchirurgicales sans réveil pour des approches de microscopie intravital de façon à étudier l'impact des molécules immuno-thérapeutiques sur l'interactions entre les différentes cellules immunitaires.

Les modèles murins, représentant 162 animaux, pour nos études suivront une démarche éthique stricte qui prend en compte la règle des 3R :

Réduire et Remplacer :

- Nous effectuerons les mises au point nécessaires in vitro avant de procéder à des procédures chez l'animal.

- La génération de cellules dendritiques sera effectué in vitro à partir de cellule de moelle osseuse ce qui permet de réduire considérablement le nombre d'animaux nécessaires pour obtenir ces cellules.

Raffiner :

- Utilisation d'une approche méthodologique qui élimine la majorité de la variabilité biologique et qui augmente notre sensibilité de détection des différences entre les groupes expérimentaux (expériences répétées au moins 3 fois). Celle-ci combinée avec la quantification d'un nombre maximal de paramètres sur le même échantillon, permet de réduire le nombre total d'animaux utilisés dans notre projet.

- Suivi quotidien des animaux pour détecter précocement des altérations de l'état général des animaux (points limites) et l'utilisation de l'anesthésie dans toutes nos procédures de façon à minimiser l'angoisse et la souffrance à chaque procédure.

10403 L'adénocarcinome du pancréas (ADKP) est le type de cancer pancréatique le plus répandu (85% des néoplasmes pancréatiques). Il représente la 4ème cause de mortalité par cancer, avec un taux de survie à 5 ans inférieur à 5%. Ce cancer est prédit pour devenir la 2ème cause de mortalité par cancer dans les pays industrialisés à partir de 2030, si aucun progrès significatif n'est apporté dans les prochaines années. Le mauvais pronostic de ces patients provient du diagnostic tardif et d'une résistance acquise aux chimiothérapies conventionnelles. La prédominance en protéines de la Matrice ExtraCellulaire (MEC) constitue une caractéristique de ce cancer et participe notamment à sa résistance aux traitements actuels. Parmi les glycoprotéines matricielles, la famille des Ténascines (TNs) compte 4 membres (C, R, W et X) qui partagent une structure modulaire commune. Dans le microenvironnement tumoral, il a été démontré que les TNC et TNW pouvaient stimuler la progression des cellules tumorales. A l'inverse de ces deux protéines, le rôle de la TNX dans la progression tumorale reste peu exploré.

Des études de banques de données géniques ont permis de montrer que dans les adénocarcinomes pancréatiques et mammaires, les ARNm codant la protéine TNX étaient sous-exprimés dans les tissus tumoraux comparativement aux tissus adjacents histologiquement sains. Au contraire, les ARNm codant la TNC étaient sur-exprimés. Par ailleurs, des études in vitro ont permis de mettre en évidence le rôle inhibiteur de la TNX sur l'étalement, la migration et l'invasion de cellules tumorales dans des gels de collagène mimant un microenvironnement en 3 dimensions.

Ces études préliminaires réalisées *in silico* et *in vitro* permettent d'envisager un rôle potentiellement oncosuppresseur de la TNX.

Le but de l'étude est donc d'analyser précisément le rôle de la TNX dans la carcinogenèse pancréatique *in vivo*. Le modèle mammifère le plus adapté pour réaliser cette étude reste la souris puisqu'au travers des différents modèles transgéniques disponibles, il permet d'étudier précisément le développement tumoral dans un organisme complexe s'apparentant à l'homme. Pour se faire, nous utiliserons un modèle de prédisposition au cancer pancréatique permettant d'induire spécifiquement l'expression d'une protéine KRAS mutée sur le codon 12 dans les cellules pancréatiques. Cette mutation de KRAS est retrouvée dans 75 à 95 % des cancers du pancréas, mais aussi dans les lésions précancéreuses. Ces souris exprimant la protéine KRAS mutée dans le pancréas seront croisées avec des souris invalidées ou non pour le gène de la TNX. Ainsi, nous pourrons suivre le rôle de la TNX au cours du développement tumoral et les métastases potentiellement induites dans le foie, le poumon, le péritoine et l'intestin.

Ce projet implique d'une part l'élevage de souris *Tnx*^{-/-}. Ces souris sont à phénotype dommageable puisqu'elles présentent une hyperlaxité de la peau et une faiblesse musculaire comme ce qui a été décrit chez certains patients Ehlers-Danlos présentant une déficience au niveau du gène *TNXB*. Cependant, l'espérance de vie de ces souris dépasse 1 an et nous savons d'ores et déjà que ces souris sont fertiles. Pour cette procédure d'élevage, nous prévoyons d'utiliser 20 souris par an pendant 5 ans.

Deux procédures sont prévues par la suite dans ce projet :

(1) La première consistera à analyser les souris de chaque génotype (*KRAS*⁺ invalidées ou non pour la TNX) à des âges représentatifs de l'évolution de l'adénocarcinome pancréatique dans ce modèle de prédisposition (50, 100, 150 et 200 jours). Après euthanasie aux temps indiqués, différents organes seront prélevés (pancréas, foie, péritoine et duodénum) et fragmentés de manière à analyser les échantillons par histologie, immunohistochimie, qRT-PCR et Western Blot. 10 souris par lot seront analysées, ce qui correspond à un nombre suffisant de souris pour réaliser une étude statistique robuste sur l'ensemble des expériences réalisées. 80 souris seront donc utilisées au total pour cette procédure.

(2) La seconde étude visera à suivre en temps réel (1 fois par mois, sous anesthésie gazeuse à l'isoflurane) le développement de la pathologie par échographie à haute résolution couplée à une analyse photoacoustique (VEVO@LAZR, VisualSonics). Les animaux (10 animaux/génotype) seront euthanasiés à l'atteinte de point limite ou à 80 semaines de développement si aucun point limite n'est atteint et les différents organes précités seront analysés comme pour la procédure précédente. A nouveau, ce nombre d'animaux est nécessaire et suffisant pour réaliser une étude statistique robuste. 20 souris seront donc utilisées au total pour cette procédure.

L'ensemble de ce projet implique donc 200 souris.

Une attention particulière sera apportée au bien-être de l'animal : les patients atteints d'adénocarcinome pancréatique présentent une perte de poids moyenne de 8,1% dans les 3 mois précédant le diagnostic. Les souris seront pesées 1 fois par semaine. La pesée nous permettra d'établir une courbe de croissance pour chaque animal et de déterminer le poids maximal. Les animaux seront euthanasiés si la perte de poids excède 20% du poids maximal de l'animal. Les patients atteints d'un cancer du pancréas développent couramment une jaunisse. Ce symptôme est retrouvé chez la souris dans le modèle utilisé de prédisposition au cancer du pancréas. Nous surveillerons donc le développement éventuel d'un ictère au niveau du dos des pattes des souris et des oreilles et la couleur de selles. Par ailleurs, d'autres signes évocateurs de mal-être seront également suivis de manière tri-hebdomadaire (poils hirsutes, prostration, détresse respiratoire, formation de papillome entravant le bien-être de l'animal) et conduiront à l'euthanasie de celui-ci si ils étaient observés.

10404 L'hémophilie est une maladie hémorragique héréditaire due à l'absence ou au déficit d'un facteur de la coagulation. L'hémophilie A, la forme la plus répandue qui frappe environ 80% des patients hémophiles, est causée par des mutations génétiques au niveau du Facteur VIII (FVIII) et concerne une naissance sur 5000. La personne hémophile ne parvient pas à former un caillot solide au cours du processus de la coagulation et souffre de saignements spontanés ou incontrôlables après un

traumatisme. Les épisodes hémorragiques répétés endommagent durablement les articulations et les os et, sans traitement approprié, la destruction articulaire peut être irréversible. Les hémorragies internes, si elles ne sont pas prises en charge, peuvent être mortelles. Aujourd'hui, le traitement consiste à administrer plusieurs fois par semaine le facteur de la coagulation défaillant dans le système sanguin des patients. Chez 30% des patients traités, une réponse immunitaire contre le facteur injecté se développe, rendant ainsi inefficace ce traitement. Notre projet vise à développer une nouvelle stratégie thérapeutique pour l'hémophilie A, en corrigeant de façon permanente le défaut génétique du facteur VIII dans les cellules souches sanguines. Cette stratégie pourra ensuite être utilisée pour traiter d'autres maladies génétiques qui nécessitent un traitement substitutif à long terme comme l'hémophilie B (déficience de Facteur IX) ou les mucopolysaccharidoses (maladies génétiques dégénératives lysosomales).

Les modèles de culture in vitro des cellules souches ne peuvent pas reproduire complètement la complexité du système sanguin, notamment en termes de prolifération et de différenciation en différents types de cellules sanguines. De plus, une fois les cellules souches sanguines corrigées par notre traitement, il sera nécessaire de vérifier leur capacité à se greffer dans la moelle osseuse dans un organisme entier et à reconstituer ensuite les différents types de cellules sanguines. Pour toutes ces raisons, il est absolument nécessaire de réaliser une étude in vivo. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés pour ce projet, l'efficacité de plusieurs molécules utilisées pour corriger le défaut génétique a été comparée in vitro sur des cellules souches sanguines humaines. Seulement les 4 meilleures molécules seront utilisées pour les études in vivo. Ainsi, ces études in vitro nous ont permis de réduire significativement le nombre d'animaux prévu dans cette expérimentation (jusqu'à 50 animaux).

Afin de permettre la prise de greffe de cellules humaines dans la moelle osseuse, les souris utilisées sont immunodéficientes. Les cellules transplantées seront soit amenées à mourir ou à se greffer dans la moelle osseuse où elles pourront avoir un effet thérapeutique. La mise en aplasie liée à l'irradiation sera accompagnée d'une mise à disposition d'un aliment appétant, facile à ingérer et posé sur le plancher de la cage. Tous les actes tels qu'injections intraveineuses et prélèvements de sang seront effectués sous anesthésie gazeuse.

Le nombre de souris nécessaire a été estimé à 10 souris par groupe grâce à une étude statistique prédictive (test de comparaison qualitative de groupes).

Notre projet durera 3 ans et nécessitera l'utilisation totale de 80 souris.

10405 Les Ténascines sont des molécules de la matrice extracellulaire impliquées dans de nombreux cancers, dont la surexpression est associée à un faible facteur pronostique. Nous étudions dans notre laboratoire à l'aide de plusieurs modèles in vitro et in vivo, une molécule spécifique appartenant à la famille des Ténascines : la Ténacine C (TNC). Cette molécule fortement exprimée dans les tumeurs, a été montrée comme favorisant la progression métastatique. De ce fait, nous avons développé précédemment un modèle murin de cancer mammaire, appelé NT193, basé sur une lignée cellulaire ayant été établie à partir d'une tumeur issue d'une souris transgénique MMTV-NeuNT, développant spontanément des tumeurs du sein. Nous avons observé et confirmé dans ce modèle, que la TNC impactait l'immunité tumorale et la formation de métastases.

Nous proposons maintenant de pousser l'investigation plus loin en développant de nouveaux modèles tumoraux mammaires murins (utilisant d'autres lignées cellulaires cancéreuses), dans lesquels nous voulons étudier le blocage de voies de signalisations et de mécanismes moléculaires induits par la TNC, afin de vérifier leur impact sur le développement des tumeurs, la formation de métastases et le système immunitaire.

Nous souhaitons dans un 1er temps étudier l'effet de l'inhibition de plusieurs cibles cellulaires et moléculaires régulées par la TNC (précédemment identifiées au laboratoire), sur la croissance tumorale et le développement des métastases. Pour ce faire, nous induirons des carcinomes mammaires dans des souris sauvages ou déficientes pour la TNC (WT et TNCKO), en utilisant deux types de souris immunocompétents FVB et Black6 (système immunitaire normal) dans lesquels nous allons greffer au niveau de la glande mammaire des cellules cancéreuses issues de tumeurs de sein murines (NT193 et EO771), afin d'étudier la croissance tumorale.

Nous utiliserons également un modèle murin immunodéprimé Nude (système immunitaire déficient), dans lequel des cellules de tumeurs de sein humaines (MDA-MB231) seront greffées en intra-mammaire, et/ou injectées par voie intraveineuse pour étudier la formation de métastases au niveau pulmonaire.

L'ensemble de ces cellules greffées seront préalablement invalidées pour l'une des différentes cibles identifiées comme ayant un impact dans la tumorigenèse. Les expériences de cette première partie de l'étude, nous permettront de valider notre modèle NT193 (grâce aux cellules EO771 et MDA), et de voir si les différentes cibles identifiées ont un impact in vivo sur le développement tumoral et métastatique.

Dans un second temps, nous voulons étudier dans le modèle NT193, si le fait d'immuniser des souris FVB (WT et TNCKO) par la TNC, a un effet sur l'apparition et le développement des tumeurs mammaires et des métastases pulmonaires. Le protocole sera identique à celui décrit dans la partie 1 de l'étude, mais les souris seront préalablement immunisées à la TNC par injection de la molécule 3 fois par semaine pendant 1 semaine (3 doses différentes seront testées).

Dans un troisième temps, nous voulons étudier l'effet de la TNC sur le système immunitaire dans un contexte tumorigénique. Nous avons précédemment observé dans des expériences in vitro et in vivo, une modification de l'expression de certaines molécules cibles de la TNC dans des tumeurs invalidées pour cette dernière. Des cellules NT193 invalidées ou non pour la TNC (shTNC et shCtrl) seront greffées dans des souris FVB et MMTV-NeuNT (WT et TNCKO), dans lesquels nous inhiberons ensuite ces différentes cibles en injectant des antagonistes spécifiques de chacune (en péritumorale sur 5 semaines) et analyserons :

- le développement des tumeurs mammaires
- l'apparition de métastases et l'embolisation pulmonaire
- l'impact des cellules endothéliales sur l'embolisation
- l'effet sur l'inactivation des cellules immunitaires (lymphocytes T cytotoxiques)

L'objectif étant de déterminer si les molécules étudiées peuvent être des cibles thérapeutiques potentielles.

Réduire :

Le nombre d'animaux nécessaire a été déterminé au minimum mais néanmoins suffisamment pour pouvoir réaliser une analyse statistique pertinente. L'algorithme de Lamorte est utilisé pour déterminer la taille de l'échantillon (outil de calcul de la taille des échantillons biologiques, Université de Boston). De ce fait 4000 souris seront utilisées au total pour l'ensemble de cette étude (20 souris par conditions expérimentales : nous devons doubler le nombre par groupe, car la moitié des souris greffées subissent un rejet des greffons).

Raffiner :

Le protocole expérimental prend en compte un potentiel impact sur la souffrance animale et différents critères ont été établis pour justifier un arrêt de l'expérience en cours. Des points limites ont notamment été établis pour éviter toute souffrance animale. Les souris seront également pesées et leur état général évalué 3 fois par semaine. Les données issues de ce suivi individuel seront enregistrées dans un tableau spécifique définissant les points limites expérimentaux (cf. Annexe), et aussitôt analysées. Par conséquent, si un animal atteint à un moment donné de l'expérience, un de ces points limites définis, il sera immédiatement euthanasié. De plus, si une souris présentait des symptômes traduisant l'apparition de douleurs, une injection en IP d'un analgésique sera effectuée une fois par jour jusqu'à disparition des symptômes.

Remplacement :

Le modèle animal est nécessaire car il n'existe pas de modèle pour reproduire in vitro l'ensemble des mécanismes impliqués dans cette étude.

10406 De nombreuses études appuient l'hypothèse que l'exposition professionnelle aux pesticides est associée à l'apparition de pathologies telles que la maladie de Parkinson, le cancer de la prostate ainsi que les lymphomes et myélomes multiples. D'autres perturbations biologiques sont aussi suspectées d'être liées à l'exposition aux pesticides comme les troubles métaboliques et les altérations du système immunitaire; cependant les arguments mécanistiques sur ces

problématiques sont encore parcellaires pour conclure à une relation de cause à effet et nécessitent donc d'être approfondis.

L'objectif de ce projet est d'évaluer l'impact d'une exposition professionnelle aux pesticides sur l'homéostasie métabolique, la production des cellules sanguines dans la moelle osseuse, le cerveau et le système immunitaire. De plus, l'interaction de ces pesticides avec le microbiote intestinal et les conséquences de son déséquilibre sur les dérégulations métaboliques seront étudiées. L'exposition professionnelle se fait essentiellement par voie cutanée, et la pratique agricole la plus exposante est la récolte. Des études préliminaires ont permis d'identifier et de quantifier un cocktail de pesticides présents sur les pommes lors de la récolte. Ainsi, nous aborderons notre problématique en étudiant l'impact chez l'animal (souris) d'une exposition cutanée au cocktail de composés auxquels l'agriculteur est réellement exposé lors de la récolte des pommes. Les doses auxquelles sont exposés les récoltants (exprimées en μg par surface de peau) seront adaptées à la surface cutanée dédiée à l'exposition (1cm^2) de la souris.

Nous étudierons les perturbations métaboliques induites par cette exposition aux pesticides lors d'un régime alimentaire normal ou enrichi en graisses. Diverses approches seront réalisées, au niveau hépatique, urinaire (qui reflètent le statut métabolique général), ainsi qu'au niveau du cerveau dont les conséquences peuvent être liées au développement de la maladie de Parkinson et peuvent aussi interférer sur le fonctionnement de la physiologie hépatique.

Nous respecterons la règle des 3R, qui vise à remplacer, réduire et raffiner. L'utilisation du modèle animal se justifie car le modèle cellulaire n'est pas adapté pour prendre en compte toutes les interactions inter-organes impliquées dans le métabolisme. Pour ce projet un minimum de 96 animaux serait nécessaire, soit 12 animaux mâles et 12 animaux femelles, (12 étant le nombre minimal permettant d'observer des modifications significatives) exposés ou non aux pesticides, et ayant été soumis ou non à un régime enrichi en graisse, pour étudier les conséquences de cette exposition sur un état métabolique normal, et un état métabolique perturbé. Cependant, l'étude serait renouvelée si une confirmation ou un approfondissement des résultats obtenus étaient nécessaires. Ainsi, un total maximal de 192 animaux sera nécessaire sur une durée de 2 ans. Les animaux seront hébergés dans un environnement contrôlé, enrichi d'un abri inox et de matériaux doux adaptés leur permettant de se constituer un nid. Le raffinement sera complété par la mise en place de mesures pour réduire la douleur pendant les procédures expérimentales telles que l'anesthésie et l'usage de tapis chauffant. Des points limites sont également définis pour éviter toute souffrance potentielle.

10407 Les immunothérapies actuelles sont en plein essor dans le cadre du traitement contre le cancer. Cependant, malgré un effet démontré sur la régression tumorale et l'augmentation de la survie globale, ces thérapies ne sont effectives que dans 20 % à 40 % des patients. Une des hypothèses actuelles pour expliquer la différence de réponse entre patients est la présence ou non d'une réponse immunitaire active pré existante au traitement. Un des domaines actifs de recherche est ainsi lié à la mise au point de modalités de traitements complémentaires qui pourraient soit pré-activer une réponse immunitaire anti-tumorale avant une immunothérapie, soit amplifier cette réponse suite ou en parallèle d'une immunothérapie. L'objectif de notre étude est 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 antitumorale 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. 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 à minima, avec un nombre total de 160 souris pour 8 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. Les paramètres ultrasonores appliqués auront été préalablement sélectionnés par simulations numériques et tirs sur tissus ex vivo. Une définition précise des points limites a été effectuée et ceux-ci seront surveillés régulièrement, contribuant au bien-être animal. L'environnement et l'habitat dans lequel évolueront les souris seront optimisés (nombre de souris par cage, ajout de cotons, ...) et toutes les précautions nécessaires seront prises afin que nos animaux soient le moins stressés possibles. Les traitements seront effectués sous anesthésie gazeuse et traitement antalgique afin de limiter au possible le stress ou une possible douleur.

10408 1. Contexte, objectif et retombées du projet

Le TGF β est une cytokine assurant de nombreuses fonctions physiologiques comme la régulation de l'immunité, la cicatrisation, le développement et l'angiogenèse. Elle est communément décrite comme un suppresseur de tumeur dans les phases précoces de la tumorigénèse (cystosie, apoptose) et comme un promoteur de tumeur dans les phases tardives de la progression tumorale (dédifférenciation, métastases). Dans le contexte de l'adénocarcinome du pancréas, la relevance de cette cytokine a été démontrée dans de nombreuses études. Le TGF β est présent en forte quantité à toutes les étapes de la progression tumorale pancréatique, suggérant un rôle pro-tumoral tout au long du développement de la pathologie. De plus, sa voie de signalisation est inactivée dans 50% des tumeurs. La localisation anatomique du pancréas ainsi que ses propriétés infiltrantes font de la tumeur pancréatique une tumeur propice à la dissémination métastatique.

Nous avons démontré in vitro que le TGF β est capable d'activer les facteurs transcriptionnels Smad2 et Smad3 dans des lignées cellulaires issues d'adénocarcinome du pancréas (ADKP) et dépourvues du facteur transcriptionnel Smad4, un acteur principal de la voie « canonique » du TGF β (travaux non publiés). Nous avons de même montré que les complexes Smad2/3 activent l'expression de gènes cibles du TGF β en absence de Smad4. Nous faisons l'hypothèse que les facteurs transcriptionnels Smad2 et Smad3 peuvent être involués dans les effets pro-oncogéniques du TGF β qui favorisent la progression de l'ADKP, notamment la prolifération et la dissémination tumorale ou métastase. Nous proposons donc d'approfondir sur ce sujet et d'analyser in vivo le rôle de Smad2 et Smad3 dans la prolifération et la dissémination des tumeurs d'origine pancréatique, en utilisant un modèle de xénogreffe ectopique sous-cutanée et un modèle de xénogreffe intra-splénique chez des souris nude.

2. Conformité avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement

- Les expériences réalisées in vitro démontrent un rôle pro-oncogénique de Smad2 et Smad3 en absence de Smad4. Il est nécessaire de valider ces data in vivo.
- Tous les tests in vivo proposés dans cette demande reposent sur des résultats déjà obtenus in vitro.
- Nous utiliserons le nombre d'animaux minimal permettant d'obtenir des résultats statistiquement interprétables.
- 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. Des

anesthésiques ainsi que des analgésiques seront utilisés pour réduire au maximum la douleur des animaux lors des procédures.

Nombre d'animaux : Au total, 168 souris nude.

10409 Les immunothérapies actuelles sont en plein essor dans le cadre du traitement contre le cancer. Cependant, malgré un effet démontré sur la régression tumorale et l'augmentation de la survie globale, ces thérapies ne sont effectives que dans 20 % à 40 % des patients. Une des hypothèses actuelles pour expliquer la différence de réponse entre patients est la présence ou non d'une réponse immunitaire active pré existante au traitement. Un des domaines actifs de recherche est ainsi lié à la mise au point de modalités de traitements complémentaires qui pourraient soit pré-activer une réponse immunitaire anti-tumorale avant une immunothérapie, soit amplifier cette réponse suite ou en parallèle d'une immunothérapie.

L'objectif de notre étude est 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.

La démarche 3R (Remplacement, réduction, raffinement) est appliquée : le nombre d'animaux sera réduit à minima, avec un nombre total de 1380 souris pour 40 lots. Cependant, des études statistiques au cours du protocole seront effectuées et le protocole s'arrêtera dès que des résultats significatifs sont obtenus. L'étude de la réponse immunitaire est rendue impossible in vitro de par la complexité des interactions des cellules de l'immunité avec l'environnement tumoral. L'analyse de la réponse immunitaire anti-tumorale face à un traitement ne peut être remplacée par d'autres méthodes alternatives. Les paramètres ultrasonores appliqués auront été préalablement sélectionnés par simulations numériques et tirs sur tissus ex vivo. Une définition précise des points limites a été effectuée et ceux-ci seront surveillés régulièrement, contribuant au bien-être animal. L'environnement et l'habitat dans lequel évolueront les souris seront optimisés (nombre de souris par cage, ajout de cotons, ...) et toutes les précautions nécessaires seront prises afin que nos animaux soient le moins stressés possibles. Les traitements seront effectués sous anesthésie gazeuse et traitement antalgique afin de limiter au possible le stress ou une possible douleur.

10410 La toxoplasmose est une parasitose dont la prévalence chez l'Homme, en France, est d'environ 40% dans la population générale. Il s'agit dans plus de 80% des cas d'une infection asymptomatique et bénigne. Plus rarement, cette infection peut revêtir un caractère de gravité. Ainsi, chez la femme enceinte, contexte dans lequel s'effectue ce projet, l'infection par ce parasite peut être responsable d'une toxoplasmose congénitale par atteinte du fœtus (transmission transplacentaire). La gravité de celle-ci est d'autant plus importante que l'infection survient précocement au cours de la grossesse. En France, le dépistage sérologique mensuel (recherche d'anticorps dans le sang) de la toxoplasmose durant toute la durée de la grossesse chez les femmes enceintes séronégatives pour la toxoplasmose, constitue une obligation légale depuis 1978, (art.R. 2122-1 du Code de la

Santé Publique). En cas de positivité, il permet la mise en place précoce d'un traitement adapté et limite les complications pour le fœtus. L'utilisation d'antigènes est essentielle pour la recherche d'anticorps. En l'absence d'alternative de bonne qualité, l'obtention de ces antigènes passe par l'expérimentation d'animaux (souris). Suite à l'injection intrapéritonéale des parasites, l'animal va développer et produire un liquide abdominal en 3 à 7 jours (cette inoculation sera faite afin d'éviter au maximum le stress et la douleur des animaux). Ces liquides abdominaux (constituées exclusivement de parasites), après purification, sont utilisés pour des tests sérologiques permettant, chez l'Homme de faire le diagnostic de patient infecté. Nos différentes expérimentations suivront le même schéma expérimental. Des souris, en fonction des besoins de production de tests diagnostiques, seront infectées par voie péritonéale (souche à développement rapide). Au 3ème jour, les souris infectées développent un liquide abdominal de volume croissant. L'animal sera euthanasié, les parasites seront récupérés, lavés et purifiés et serviront à la production d'antigène pour le développement de tests sérologiques. Un maximum de 4 lots par an (soit 900 souris maximum) sera utilisé dans ce protocole. Sur 5 ans, 4500 souris maximum seront utilisées, soit 900 souris par an. Pour éviter toute souffrance potentielle des points limites sont définies. Notre objectif est de répondre à une forte demande des médecins spécialistes d'avoir des tests fiables permettant le diagnostic de la toxoplasmose, pathologie potentiellement grave puisque, chez l'Homme, elle peut entraîner des malformations congénitales mais aussi le décès de patients immunodéprimés.

10411 La dépression est une pathologie très répandue (en France 1 homme sur 10 et 1 femme sur 5 présentera un épisode dépressif dans sa vie). Or, les modifications observées dans le cerveau des personnes atteintes par cette maladie restent mal comprises malgré d'intenses recherches. Les traitements médicamenteux courants améliorent l'humeur dépressive qui s'accompagne d'une tristesse permanente et d'une incapacité à éprouver du plaisir (c'est-à-dire une anhédonie) dans les tâches qui en procurent habituellement. Ces médicaments modifient les taux de certains neurotransmetteurs, comme la sérotonine, dans des régions spécifiques du cerveau. Mais leur délai d'action est très long (plusieurs semaines) et leur efficacité partielle, avec un patient sur trois qui continue d'être malade même après plusieurs semaines de traitement. Pour toutes ces raisons, il est primordial d'identifier les mécanismes moléculaires qui sous-tendent les symptômes dépressifs afin d'identifier de nouvelles cibles ou de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Dans notre projet nous proposons d'étudier 3 modèles de rongeurs qui présentent, de façon stable au cours des générations, des symptômes qui rappellent ceux observés chez les humains déprimés, comme la résignation, le renoncement, la démotivation ou l'anxiété. Ces lignées de souris ont été générées par croisement successif et sélection des animaux aux comportements extrêmes dans deux tests classiquement utilisés pour tester des antidépresseurs, à savoir le test de la suspension par la queue (TST pour tail suspension test) et le test de la nage forcée (FST pour forced swim test). Cette sélection nous a permis, pour chacun des modèles, d'obtenir des souris dites « résignées », qui présentent une quasi-immobilité dans ces tests et des souris « non-résignées », qui manifestent une activité permanente lors des tests.

L'objectif de notre projet est donc d'identifier les mécanismes moléculaires qui sous-tendent le comportement de résignation. Nous rechercherons si ces comportements peuvent être modifiés par des traitements pharmacologiques classiquement utilisés chez les personnes dépressives (la fluoxétine et l'escitalopram, qui influent sur la neurotransmission sérotonergique), ainsi que par un nouveau traitement, le LY341495, qui a pour cibles les récepteurs métabotropiques du glutamate (mGlu2/mGlu3). Nous comparerons les effets de ces différents traitements sur le comportement afin de déterminer si cette nouvelle cible thérapeutique pourrait être plus efficace que les cibles classiques.

Cette étude sera réalisée en respectant la règle des 3 R. Pour étudier les processus intégrés des maladies psychiatriques, comme la dépression, on ne peut s'affranchir de modèles animaux. Néanmoins, l'utilisation d'animaux avec un phénotype stable est un avantage pour réduire le nombre d'animaux étudiés car les groupes d'animaux présentent des phénotypes plus homogènes. Dans un souci de raffinement, nous sélectionnerons les animaux avec les phénotypes les plus extrêmes, pour augmenter les chances de mettre en évidence l'effet du traitement. De plus, les animaux sont soumis à une surveillance quotidienne dans l'animalerie et durant les expériences.

On surveille la survenue éventuelle de signes de mal-être par l'observation de l'activité, de la qualité du pelage ou une réduction de poids supérieure à 10% par rapport au poids obtenu la semaine précédente (surveillance hebdomadaire du poids des souris en les pesant et les observant). Afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés dans cette étude, les traitements pharmacologiques seront réalisés uniquement chez les phénotypes « résignés ». Nous privilégierons également des situations aiguës pour réduire la détresse subie par les animaux. Nous suivrons quotidiennement l'état général des souris et leur bien-être.

Nous limiterons le nombre d'animaux de l'élevage au maximum pour la réalisation des expériences de pharmacologie comportementale. Pour cette étude le nombre d'animaux est estimé à 1 056 souris pour une période de trois ans.

Cette étude devrait nous aider à identifier les acteurs clés de la physiopathologie des troubles dépressifs majeurs et nous permettre de proposer et de tester de nouvelles cibles thérapeutiques basées sur les mécanismes moléculaires qui sont altérés dans les différents modèles que nous proposons.

10412 Le but de ce projet est de tester des inhibiteurs d'enzymes responsables du stress oxydatif, les NADPH oxydases (NOX) dans la résistance des cancers aux thérapies anti-angiogéniques.

L'angiogenèse est un processus essentiel au développement tumoral, caractéristiques principales des cellules cancéreuses et des tumeurs. Ces caractéristiques permettent de définir et d'organiser le développement tumoral qui comprend une activation continue des signaux de prolifération, une insensibilité aux processus inhibant la croissance cellulaire, une résistance à la mort cellulaire, une immortalité répliquative, une activation des processus d'invasion et de formation de métastases.

Parmi les nouvelles stratégies thérapeutiques, le blocage de l'angiogenèse a fait l'objet de nombreux essais cliniques, en particulier celles basées sur le VEGF. Toutefois, si cette approche a été validée par l'utilisation en clinique du premier anticorps anti-VEGF puis de molécules de synthèse inhibitrices de l'activité kinase de récepteurs impliqués dans l'angiogenèse, les dernières études pré et cliniques ont modéré l'enthousiasme initial associé à ces thérapies. En effet, un autre enjeu important pour l'avenir des thérapeutiques anti-angiogéniques est l'acquisition de résistances au traitement.

La littérature suggère un rôle déterminant du stress oxydant, notamment de NOX1 et NOX4, dans l'angiogenèse. Nous avons identifié des molécules inhibitrices de ces NOXs qui pourraient être une alternative dans les cancers résistants aux thérapies anti-angiogéniques classiques.

Nous utiliserons deux procédures pour analyser l'effet des inhibiteurs des NOXs sur l'angiogenèse et dans la résistance des cancers aux thérapies anti-angiogéniques :

Procédure expérimentale 1 (inhibition de l'angiogenèse) :

Les cellules endothéliales primaires représentent le modèle expérimental de prédilection pour les modèles d'angiogenèse. Nous allons donc injecter sous la peau des animaux (male CB-17 SCID mice) des GFP-HDMECs (Human Dermal Microvascular Endothelial cells) sous forme de sphères mixées à une matrice contenant du VEGF ou du VEGF + anti-VEGF. La quantification d'un marquage fluorescent permettra d'analyser le développement des nouveaux vaisseaux.

Design :

- groupe 1 contrôle : 10 souris avec une matrice différente de chaque côté
- groupe 2, 3, 4 inhibiteur (high, medium, low dose) : 10 souris avec une matrice différente de chaque côté, traitées par gavage quotidien avec l'inhibiteur NOX à 3 doses différentes (10 souris/dose).

Total de 40 souris par expérience, 5 composés différents seront testés : 200 souris au total

Procédure expérimentale 2 (Résistance des cancers) :

Une injection orthotopique de cellules PANC-1 (Human Pancreatic cancer cell line) résistantes au Bevacizumab sera effectuée dans le pancréas de souris (male athymic nude mice). Nous regarderons l'effet de nos inhibiteurs de NOXs sur la prise et la croissance tumorale.

Design (10 animaux par groupe) :

- groupe 1 : contrôle
- groupes 2 : anti-VEGF
- groupes 3 : inhibiteurs NOXs (dose max efficace dans la procédure expérimentale 1)
- groupes 4 : combinaison inhibiteurs NOXs + anti-VEGF

Soit 40 souris par expérience, 5 composés différents seront testés, soit 200 souris total
Total de souris pour les deux procédures : 400.

Le test statistique T-test déterminera les différences significatives entre les moyennes des groupes dans une analyse de variance.

Des tests in vitro préliminaires seront utilisés en utilisant des cellules endothéliales ainsi que les PANC-1 stimulées au VEGF pour permettre la sélection des molécules les plus puissantes avant le passage sur l'animal. Cette sélection s'effectuera sur le pouvoir des molécules Genkyotex à réduire la prolifération et la dissémination de ces cellules. De plus seules les molécules présentant des propriétés ADME ainsi que de pharmacocinétique compatibles avec une utilisation in vivo seront utilisées chez l'animal.

Lors de l'injection orthotopique, nous veillerons à respecter les conditions d'asepsie (vétédine + spray de lidocaïne avant injection des cellules) et les animaux seront anesthésiés avec de l'isoflurane 3%.

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 d'hébergement adaptées (5 souris par cage, alimentation et abreuvement à volonté). L'environnement sera enrichi par du coton pour nidifier et un dôme pour se cacher.

10413 Les myopathies regroupent un ensemble de maladies qui touchent les muscles. Ces myopathies peuvent être de différentes causes. Elles peuvent être d'origine génétique affectant la production de protéines impliquées dans la formation des muscles et responsables d'une faiblesse progressive des muscles des jambes, des bras, du visage et du cœur. Les myopathies peuvent aussi être d'origine inflammatoire ; elles se manifestent dans ce cas par une douleur et une faiblesse musculaire qui peuvent évoluer vers une diminution de la masse musculaire et une invalidité grave. Les cellules Natural Killer (NK) constituent un type particulier de cellules de l'immunité. Leur rôle dans les maladies musculaires n'a jamais été étudié de manière systématique. Dans un travail récent, il a été mis en évidence la présence de cellules NK dans le muscle de patients avec myopathies inflammatoires. Des résultats préliminaires chez la souris indiquent que les cellules NK sont indétectables dans le muscle normal, mais présents en cas de maladie musculaire d'origine génétique caractérisée par une dégénérescence /régénération musculaire, et ce dans deux lignées différentes. Ces données suggèrent que les cellules NK puissent être impliqués dans le processus de dégénérescence /régénération musculaire qui est commun aux deux modèles analysés. L'objectif de ce projet est d'étudier le rôle des cellules NK dans la régénération musculaire post-lésionnelle.

L'utilisation de modèles expérimentaux murins et modèles transgéniques est indispensable et permettra d'étudier la cinétique de recrutement des cellules NK ainsi que leur rôle dans le processus de dégénérescence -régénération induit, ce qui n'est pas reproductible in vitro. Par ailleurs ce type d'étude nécessite d'utiliser le muscle en entier, ce qui ne peut se faire chez l'homme.

Tout au long de ces études in vivo, nous allons respecter la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner). Nous limitons le projet aux seules expériences considérées comme absolument indispensables chez l'animal et toutes les méthodes alternatives à l'utilisation animale seront explorées. Nous essayerons au maximum de regrouper les procédures expérimentales afin de réduire le nombre de souris utilisées dans ce projet. Toutes les expérimentations suivront un protocole expérimental soigneusement rédigé incluant des points limites (quantification de la douleur par des échelles de douleurs basées sur le comportement et évaluation de la faiblesse musculaire). Les animaux seront suivis quotidiennement afin d'évaluer leur bien-être. Nous utiliserons des antidouleurs lors de l'induction de lésion musculaire et l'accès à la nourriture et l'eau sera facilitée. Lors des expérimentations, les animaux mâles seront hébergés maximum par 4 et par 2 après les lésions musculaires pour leur permettre un comportement social tout en limitant les éventuelles altercations. L'environnement sera enrichi avec des maisons en plastique et du coton pour que les animaux puissent faire des nids.

Dans ce projet nous utiliseront 1058 souris sur une durée de 5 ans.

10414 Les maladies auto-immunes connaissent actuellement une prévalence croissante, ce qui en fait un enjeu majeur de santé publique. Ce sont des pathologies complexes, le plus souvent multifactorielles et spécifiques d'un organe, rendant leur étude chez l'Homme difficile. Les traitements des maladies auto-immunes ont globalement pour objectif de contrôler et de réduire la réponse immunitaire et l'inflammation induites mais sans toutefois agir de façon spécifique sur la pathologie. Pour cela, il est important d'identifier et de caractériser au mieux les voies d'implication afin de cibler l'immunothérapie.

L'étude du rôle des molécules de co-stimulation dans la survenue de l'auto-immunité en général, dans le contrôle de la tolérance immunitaire et dans l'orientation de la réponse auto-immune vers un tissu déterminé est complexe et seule l'expérimentation animale permettra d'en étudier les mécanismes.

Nous nous focaliserons ici sur le diabète auto-immun (diabète de type 1) et la neuromyopathie auto-immune.

En premier lieu, nous créerons par croisement deux nouvelles lignées de souris invalidées pour le gène d'intérêt. Ces souris seront utilisées pour faire des expériences de transferts de la maladie auto-immune afin de caractériser les cellules et les voies immunitaires qui seront impliquées dans le développement de ces pathologies. Ces souris nous permettront également d'identifier et de mieux caractériser les cellules T impliquées dans ces pathologies.

Nous utiliserons différentes lignées de souris génétiquement modifiées afin de caractériser les mécanismes impliqués dans le développement d'une maladie auto-immune selon le tissu ciblé et les voies de co-stimulations impliquées, notamment celle de la molécule TIGIT. Nous cherchons ainsi à mettre au point une immunothérapie spécifique de l'auto-immunité.

Le nombre total de souris nécessaires au développement de ce projet sera de 402 animaux.

Pour cette étude, le nombre d'animaux utilisés est réduit au minimum en optimisant les statistiques et les groupes expérimentaux pour une interprétation scientifique correcte. De plus, afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux, les procédures de transfert de diabète se feront sous anesthésie générale. Enfin, des points-limites ont été établis, entraînant l'euthanasie anticipée de l'animal si nécessaire.

A terme, les résultats de ce projet permettront de comprendre plus précisément les mécanismes impliqués dans le développement des maladies auto-immunes et de développer une immunothérapie plus ciblée chez les patients qui en sont atteints.

10415 Les valeurs sanguines des ions doivent être maintenues à l'intérieur d'intervalles étroits, sous peine d'entraîner des désordres plus ou moins graves, parfois mortels. Le rôle principal du rein est de maintenir des valeurs dans des limites acceptables en contrôlant la quantité de chaque ion éliminé dans l'urine. Ce rôle est assuré par les divers segments tubulaires qui composent les tubules rénaux et qui concourent à former l'urine définitive. La contribution de chaque segment est spécifique, dépendante des protéines que ce segment exprime de manière régulée.

L'étude de nombreux modèles animaux nécessite de pouvoir caractériser l'expression et l'activité des protéines spécifiques à chaque segment tubulaire. Peu de groupes dans le monde maîtrisent suffisamment la technique de dissection tubulaire pour obtenir des quantités de segments tubulaires spécifiques permettant des analyses in vitro de l'expression des gènes, des protéines et de leurs activités. Nous possédons cette technique, raison pour laquelle de nombreux chercheurs nous demandent de faire ce travail dans le cadre de collaborations. Nous avons donc une contribution technologique à ces programmes de recherche. L'espèce utilisée est la souris : c'est actuellement l'espèce pour laquelle le plus grand nombre de modèles génétiquement modifiés est disponible et celle pour laquelle nous recevons des demandes de prestation. Le nombre estimé d'animaux est de 200, sur la base de l'expérience acquise les dernières années à l'occasion des demandes de prestation.

Nous appliquons la règle des 3R du mieux possible lors de l'élaboration du protocole d'étude. Tous les prélèvements sont réalisés sous anesthésie générale. Le nombre d'animaux est calculé en tenant compte de la variabilité des paramètres d'intérêt.

Les mesures réalisées tiennent compte de l'état de l'animal pour avoir la meilleure performance des mesures réalisées (raffinement) et réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. Il n'y a pas

d'alternative à des approches, les modèles cellulaires existant ne permettant pas de rendre compte de la complexité du fonctionnement des segments tubulaires rénaux intacts.

10416 Le contexte scientifique : La maladie de Huntington (MH) est une maladie neurodégénérative caractérisée par des perturbations progressives d'ordre moteur, cognitif, et psychiatrique/comportemental. Cette maladie est la plus fréquente des maladies génétiques affectant le cerveau. Sur le plan des lésions, elle est caractérisée par une dégénérescence neuronale progressive et particulièrement grave du striatum, zone du cerveau impliquée dans le contrôle des mouvements. Il n'y a actuellement aucun moyen de stopper ou d'inverser l'évolution de cette maladie qui est toujours mortelle 10-15 ans après l'apparition des premiers symptômes. Le remplacement des neurones perdus par une greffe de cellules saines remplissant la même fonction (thérapie cellulaire) est actuellement la seule approche qui semble pouvoir ralentir le cours de cette maladie. Les cellules souches pluripotentes humaines (CSPh) sont aujourd'hui considérées comme un matériel biologique de choix pour cette approche de thérapie cellulaire. En effet, les CSP ont une capacité d'auto-renouvellement illimité et peuvent se différencier dans n'importe lequel des types cellulaires de l'organisme.

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

Pourquoi travailler chez l'animal? -

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

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

Combien de rat pour quels résultats ? Le projet suivra un processus itératif : certaines expériences ne seront commencées que si les précédentes sont validées avec succès. Plusieurs types d'animaux seront suivis et comparés : des animaux sans lésion, des animaux avec lésion du striatum, des animaux avec lésion du striatum et greffés. Le nombre de rats par groupe varie entre 3 (expériences pilotes) et 16 rats (pour les expériences de comportement) ceci afin de s'assurer que les expériences soient interprétables statistiquement. Jusqu'à 457 rats seront utilisés sur une période de 5 ans. Les résultats attendus seront de plusieurs ordre : 1) valider la pertinence thérapeutique de greffons striataux issus de CSPh en établissant la preuve de concept de l'efficacité

de ce genre de greffon ; 2) mieux comprendre les déterminants d'une réparation fonctionnelle d'un striatum lésé au QA par des cellules neuronales du greffon ; 3) mieux comprendre l'impact de la mutation causale de la maladie de Huntington dans les dysfonctions du striatum chez les patients. Les protocoles de chirurgies stéréotaxiques prévus ont été mis au point de façon à réduire au maximum la douleur (sous anesthésie générale et utilisation systématique d'analgésiques per et post-opératoires), et le stress induit par cette étude (suivi journalier par les zootechniciens et hebdomadaire par les expérimentateurs). En outre, le bien-être des animaux reposera sur la présence d'accessoires d'enrichissement de leur milieu de vie. Leur suivi sera assuré quotidiennement.

10417 Le diabète constitue un problème de santé publique qui, selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), représentera la 7ème cause de mortalité d'ici 2030. Chez les patients diabétiques, la mortalité est majoritairement liée aux maladies cardiaques, telles que l'insuffisance cardiaque et les arythmies, qui peut être indépendante de toutes pathologies vasculaires et appelée cardiomyopathie diabétique. Ces maladies cardiaques, ou cardiomyopathie diabétique, se définissent par une diminution de la contraction et de la relaxation cardiaque. Malgré les traitements actuels, la mortalité cardiaque chez les patients diabétiques ne cesse d'augmenter soulignant des lacunes dans notre compréhension des mécanismes impliqués. Notre projet vise à étudier le rôle de notre protéine d'intérêt dans la cardiomyopathie diabétique. Cette protéine ayant été reconnue récemment comme protéine clé de la défaillance cardiaque et de l'arythmique. Nous utiliserons, d'une part, des souris naturellement diabétiques (Diabète de type 2) invalidées de notre protéine d'intérêt et des souris transgéniques présentant une invalidation de notre protéine d'intérêt et rendues diabétiques par un produit (Diabète de type 1). Ces deux modèles nous permettront, d'étudier le rôle protecteur potentiel de cette protéine sur la cardiomyopathie diabétique. L'utilisation d'animaux est indispensable pour évaluer notre hypothèse car il est nécessaire d'étudier la fonction cardiaque dans un contexte physiologique et physiopathologique, notamment au cours du diabète, une maladie complexe et multifactorielle impossible à simuler *in vitro*. De plus l'évaluation de la fonction cardiaque est à réaliser sur l'animal entier adulte afin de s'approcher le plus possible de la pathologie humaine. Dans le cadre de ce projet, toutes les procédures sont conçues pour appliquer le principe éthique des 3R (Réduction, Raffinement et Remplacement). Une planification minutieuse a permis de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en préservant la validité statistique de l'étude. Le suivi du développement de la cardiomyopathie diabétique sera réalisé par échocardiographie, une méthode non invasive. Toutes les procédures seront pratiquées en utilisant des anesthésiques et des analgésiques. En fin d'expérimentation, les animaux seront euthanasiés et les tissus prélevés afin de minimiser le nombre d'animaux utilisés. Des expériences de biochimie et des études sur cellules isolées seront effectuées dans la mesure du possible à partir des tissus collectés afin aussi de réduire le nombre d'animaux utilisés. Les animaux feront l'objet d'un suivi rapproché afin d'éviter toute souffrance liée aux diverses complications liées au diabète. Enfin, les cages des animaux seront enrichies et les animaux seront suivis par un personnel spécifiquement formé. Le nombre total de souris utilisées sera de 210 sur l'ensemble de l'étude en combinant plusieurs approches expérimentales par différent expérimentateur sur le même animal.

10418 Les rayonnements ionisants (RI) peuvent affecter la santé des organismes. Des études de laboratoire et de terrain réalisées à Tchernobyl et Fukushima, ont montré que les oiseaux présentaient une radiosensibilité élevée. Mais les mécanismes d'action toxique restent encore mal connus. Ce projet a pour objectif d'évaluer les effets de faibles doses de RI sur un modèle de vertébré terrestre, l'oiseau *Taeniopygia guttata* (diamant mandarin). Cette étude de laboratoire viendra compléter les approches actuellement développées sur la mésange charbonnière, sur le site de Tchernobyl.

Ces études *in situ* font partie de la 3ème étape de l'analyse d'impact écologique des RI. Dans le respect de la méthodologie européenne, il n'existe pas à ce jour de méthodes alternatives. Les données acquises *in situ* permettent de déterminer a priori l'effectif nécessaire à la robustesse des analyses statistiques pour adapter le nombre d'animaux à utiliser. Les points limites sont connus

chez cette espèce, régulièrement utilisée en expérimentation animale. Principalement axés sur le suivi du comportement social et d'alimentation, ils permettent de réduire la souffrance animale.

Cette étude réalisée en conditions contrôlées de laboratoire permettra d'identifier les facteurs biologiques clés gouvernant la radiosensibilité de ce taxon et permettra de disposer de signaux d'alerte utilisables pour une stratégie de conservation des espèces sauvages.

Afin d'une part d'être utilisable sur le terrain et d'autre part ne pas entraîner l'euthanasie des animaux, cette étude dose/réponse consistera à identifier des marqueurs mesurés uniquement dans le sang, le sperme et les plumes. A l'issue de 14 jours d'acclimatation, les oiseaux mâles (n=16 par condition) seront soumis à 4 débits de doses d'irradiation gamma (contrôle, 50, 500 et 5000 $\mu\text{Gy/h}$) pendant 28 jours. Cette étude se focalisera plus particulièrement sur l'induction de stress, pouvant affecter le comportement et la reproduction. Par ailleurs, des biomarqueurs classiques liés aux RI seront mesurés. Des oiseaux femelles seront également utilisés (4 par condition) afin de stimuler la spermatogénèse chez les mâles.

Le modèle retenu est le diamant mandarin *Taeniopygia guttata*, espèce domestique régulièrement étudiée en éthologie et écotoxicologie.

Cette partie du projet conduira à utiliser 64 oiseaux mâles et 16 femelles (80 oiseaux au total).

10419 Mots clés : Neurostimulation ultrasonore, Ultrasons de basse énergie (LEUS), Imagerie/thérapie fonctionnelles mini-invasives, Electrophysiologie, Implant crânien, interaction cerveau/machine
Contexte, motivations et objectifs du projet :

Pendant longtemps, le seul moyen d'induire artificiellement une activité cérébrale a été la stimulation électrique. Cette technique est largement utilisée en clinique dans le cadre du traitement d'affections aussi diverses que la maladie de Parkinson, l'épilepsie, la surdité neurologique et les douleurs chroniques de manière générale. Une étude très récente a également mis en évidence des effets sur la mémoire à court et moyen termes qui pourraient ouvrir des pistes de recherche dans le cadre des maladies de types Alzheimer. Ces techniques de stimulation électrique nécessitent néanmoins l'insertion d'électrodes sous la dure-mère ou plus profondément dans la masse corticale, ce qui leur confère un caractère invasif non négligeable et peut parfois déclencher des épisodes épileptiques. De nouvelles techniques mini- ou non-invasives ont fait leur apparition ces dernières années, reposant sur une excitation électrique (transcranial Direct Current Stimulation, tDSC) ou magnétique (Transcranial Magnetic Stimulation, TMS) selon une approche extracorporelle, ne nécessitant donc plus l'insertion d'outils/d'électrodes dans le cerveau. Combinées aux technologies émergentes de planification opératoire et de navigation neuro-anatomique (imagerie IRM, réalité augmentée), ces techniques sont à l'origine de nouvelles approches d'étude des dysfonctions neuronales, très prometteuses. Cependant, ces stratégies sont fortement limitées en termes de sélectivité du traitement et d'accès aux tissus profonds.

Les ultrasons de basse énergie (Low Energy UltraSound, LEUS) pourraient être à la base d'une nouvelle approche de neurostimulation, qui s'affranchirait des limitations liées aux techniques actuelles. En effet, le caractère naturellement non invasif et dynamique des LEUS permettrait de cibler les régions corticales profondes multiples sans avoir à insérer et à déplacer de dispositif dans le cerveau. Cette approche innovante, si elle s'avérait efficace, devrait ouvrir des pistes de recherches nouvelles en thérapie fonctionnelles pour lutter contre les maladies d'origine neurologique (ex : mémoire, apprentissage, surdité profonde, handicap moteur, cécité). Plus largement, cette thématique pourrait avoir à long terme des implications dans le domaine encore balbutiant de l'interaction cerveau-machine (ex : exploration du cerveau, communication, transhumanisme).

Nous proposons dans ce projet de recherche fondamentale, d'une durée de 5 ans, une approche chirurgicale implantable sans insertion d'instrument médical dans le cerveau et le développement de prototypes d'implants ultrasonores avancés dédiés à l'étude des mécanismes de neurostimulation profonde.

Ce projet sera mené dans le respect de la règle des 3Rs : Remplacement, Réduction, Raffinement. Principe de remplacement : les mécanismes de neurostimulation par ultrasons étant encore inconnus, aucun modèle informatique ne peut se substituer à l'étude sur le vivant

Principe de réduction : dans le cadre de ce projet d'une durée de 5 ans, nous avons déjà mené plusieurs études (in vivo et) ex vivo exploratoires afin de mieux comprendre les mécanismes de stimulation ultrasonore et les effets des LEUS sur le système nerveux périphérique in vivo (invertébrés), sur le système nerveux central in vitro et ex vivo (cultures cellulaires et tranches cérébrales chez la souris).

Il est impératif désormais pour avancer dans ces travaux de recherche de poursuivre les investigations sur des modèles animaux vertébrés au stade in vivo en commençant par le petit animal pour lequel des observations préliminaires encourageantes ont déjà été réalisées récemment dans la communauté scientifique, puis sur un modèle gros animal plus proche de l'homme.

Principe de Raffinement : dans le souci du bien-être animal, les animaux impliqués bénéficieront d'un milieu socialement et matériellement enrichi, et de conditions de monitoring lors de l'intervention similaires à l'Homme. Cette étude inclura un maximum de 60 rats et de 30 porcs. Au maximum deux interventions seront réalisées par animal sous anesthésie générale, à noter que toutes les procédures seront sans réveil. Dans ces conditions, aucun effet néfaste post-traitement n'est à attendre sur les animaux engagés dans l'étude.

Le succès des recherches menées dans le cadre du protocole ici présenté ouvrirait alors la voie à :

- une seconde demande d'autorisation en complément de la présente pour valider l'innocuité et la tolérance du traitement à moyen terme sur le modèle porcin (30 jours de suivi)

- une ultime validation préclinique sur un modèle de primate non humain, afin de disposer du modèle cérébral le plus proche de l'homme. Cette partie ferait alors l'objet d'une demande d'autorisation de projet sur une plateforme habilitée pour des recherches sur le modèle babouin.

10420 En Europe, le traumatisme crânien (TC) est la cause la plus fréquente d'invalidité permanente chez les patients de moins de 40 ans. Aux lésions cérébrales primaires, engendrées par l'impact, se surajoutent, pendant les heures et les jours qui suivent, des lésions secondaires liées directement à la constitution des lésions primaires elles-mêmes, ainsi qu'à leurs conséquences physiopathologiques. Néanmoins, certaines études montrent que les patients présentant un TC sont plus à risque de développer une maladie neurodégénérative dans les années suivant le traumatisme appelé par certains encéphalopathie chronique post-traumatique. Toutefois, même si les mécanismes susceptibles de transformer cette lésion primaire mécanique en lésion dite tertiaire chronique et progressive sont encore flous, des preuves s'accumulent en faveur de l'implication de la neuroinflammation. La microglie est la principale cellule immunitaire du cerveau ; en effet, on retrouve un état inflammatoire microglial persistant jusqu'à 17 ans après le TC. Les conséquences à long terme de l'inflammation sur l'activation microgliale suggèrent une « mémoire » cellulaire de l'inflammation par des mécanismes épigénétiques. Les objectifs de ce projet visent à :

(1) décrire les phénotypes microgliaux au décours du traumatisme crânien (P8-P10-P15-P45-P90) en analysant l'expression en qPCR de gènes microgliaux ainsi que des marqueurs de la voie des récepteurs aux glucocorticoïdes,

(2) Réaliser une analyse du transcriptome,

(3) Appréhender le retentissement de la lésion traumatique par immuno-histochimie,

(4) Evaluer les modifications épigénétiques sur ce modèle de traumatisme crânien permettant à la fois une analyse de l'état de la chromatine et de la méthylation de l'ADN.

Nous travaillerons sur un modèle de traumatisme crânien modéré par lâcher de poids d'une faible hauteur sur des souriceaux de 7 jours (Septième jour de la vie postnatale : P7). Ces quatre années de travaux nécessiteront 1488 souris mâles et femelles permettant ainsi d'observer l'influence du statut hormonal sur la réponse au traumatisme.

Cette étude prendra en compte la réglementation des 3R :

Remplacement : L'étude de l'impact du traumatisme crânien sur les réseaux neuronaux à distance du TC ne peut être envisagée qu'« in vivo ». Au vu de notre expertise et des données de la littérature le modèle que nous utiliserons sera la souris OF1.

Réduction : Le nombre d'animaux estimé et les tests statistiques utilisés sont basés sur notre expérience pour ce type d'étude. Ce nombre minimum nous permettra d'être certains de répondre aux questions scientifiques de ce projet. Pour la comparaison entre souris traumatisées et souris

contrôles à un temps donné nous réaliserons un test de Student, une ANOVA à double facteurs puis un post-test de Bonferroni pour la comparaison entre les deux groupes (Trauma/Contrôles) à un temps donné entre les sexes, les analyses épigénétiques seront réalisées sur la plateforme Galaxy.eu.

Raffinement : La procédure chirurgicale (durée inférieure à 2minutes) sera réalisée sous anesthésie générale inhalatoire par Isoflurane (3%). Une analgésie post-opératoire sera réalisée en la présence de signes de douleur (en fonction d'un score établi). Les animaux seront remis dans leur nid et on vérifiera que le retour au sein du nid se fait bien. Des grilles de scoring seront proposées en fonction de l'âge des animaux déterminants ainsi les points limites prédictifs : à la phase aiguë, on surveillera la fréquence respiratoire, la recoloration des extrémités, et le tonus ; à distance du TC on réalisera une surveillance régulière de la prise de poids, de l'absence de troubles du comportement (isolement, agressivité). Les animaux seront hébergés en groupe en milieu enrichi pour minimiser leur stress.

A la fin de l'étude les animaux seront euthanasiés aux différents stades étudiés selon les méthodes réglementaires.

10421 Ce projet de type répétitif concerne l'évaluation de l'efficacité sur animal sain des produits vétérinaires destinés à être administrés aux carnivores domestiques. Suivant la directive 2001/82/EC et amendements, l'efficacité de ces produits doit être testée sur la ou les espèces cibles (chien, chat ou furet), suivant la voie d'administration, à la posologie préconisée et à des doses encadrant la dose préconisée. Dans le cas où cet effet peut être visible et représentatif chez l'animal sain et/ou qu'un modèle pathologique n'est pas envisageable ou peu fiable, l'évaluation de l'efficacité sur animal sain est justifiée.

Ces études prévoient, chez des animaux en bonne santé, le suivi :

- de paramètres physiologiques, par exemple pour un produit stimulant la prise alimentaire ou hydrique, diminuant la température corporelle ou la fréquence cardiaque,
- de paramètres sanguins, par exemple pour un produit influant sur une hormone, sur les gaz du sang, sur un paramètre biochimique ou hématologique, ou tout autre analyse d'un prélèvement biologique,
- de la plaque dentaire chez le chien et le chat après détartrage.

De plus, des études peuvent être justifiées pour évaluer un effet pharmacologique, de cibler, optimiser une posologie efficace (dose, durée et fréquence de traitement), améliorer l'efficacité d'une formulation, répondre à une question terrain (par exemple transposition d'un traitement efficace chez l'homme ou dans une espèce à une autre espèce animale).

Lors de ces études, les animaux sont suivis sur le plan général. L'espèce, le nombre d'animaux, la voie d'administration et la dose sont justifiés pour chaque étude. Des points limites sont mis en place précocement et spécifiquement pour chaque étude. Les animaux auront accès à des enrichissements du milieu spécifique à l'espèce.

Le nombre d'animaux estimé pour la période de 5 ans est de 750. Les espèces pouvant être sélectionnées pour ces études sont les carnivores domestiques.

10422 La maladie de Parkinson (MP) est la deuxième des maladies neurodégénératives les plus fréquentes dont les causes sont encore mal connues. Elle se caractérise par la mort spécifique des neurones à dopamine du cerveau et une de ses conséquences majeures est des troubles moteurs très handicapants pour les malades. Ces dernières années, de nombreuses études ont montré que l'accumulation de la forme toxique de la protéine alpha-synucléine serait une des causes de la mort des neurones à dopamine et de ces problèmes moteurs conséquents. De plus, la MP est aussi caractérisée par des symptômes non moteurs qui incluent des troubles du sommeil. Or ce type de symptômes a été, jusqu'à ces dernières années, moins étudié que les symptômes moteurs associés à la maladie. Une autre maladie, l'atrophie multisystématisée (MSA), maladie rare cette fois, partage des caractéristiques communes avec la maladie de Parkinson, notamment une accumulation de la protéine alpha-synucléine, des troubles moteurs conséquents et des troubles du sommeil.

Le but de notre projet est d'une part d'étudier la contribution du sommeil (qualité, durée des différentes phases qui le composent) dans le développement de la MP et dans celui de la MSA, et

d'autre part d'étudier l'effet de l'oxybate de sodium, connu pour améliorer le sommeil, sur la progression de ces maladies.

Nous utiliserons un modèle murin de la MP basé sur la propagation de l' α -syn mal conformée appelé corps de Lewy, injectée dans le cerveau des souris par stéréotaxie. Le modèle de la MSA sera une lignée de souris transgénique, appelée PIPSyn qui surexprime l' α -syn. Si cette lignée n'a pas de phénotype nocif pouvant altérer sa qualité de vie, elle montre néanmoins un léger déficit moteur, détectable au cours de tests comportementaux qui analysent une motricité fine.

Les animaux seront équipés d'implants pour pouvoir enregistrer leur sommeil par électroencéphalogramme et électromyogramme en 5 sessions de 48h durant 4 mois. Ils recevront en cours de ces 4 mois, par injection intrapéritonéale de l'oxybate de sodium, dont les effets seront évalués sur le sommeil par enregistrement EEG et EMG.

Les expérimentations décrites dans ce projet seront conduites sur des animaux vivants vigiles dans le plus strict respect des règles et lois éthiques en vigueur. Nous utiliserons 60 souris par an soit 180 au total pour ce projet de 3 ans. Pour le respect de la règle des 3R, la solidité de nos hypothèses de travail en utilisant des groupes de 15 animaux pour des statistiques fiables, et la qualité de la mise en œuvre des procédures, basée sur l'expertise des expérimentateurs, permettront de contrôler le nombre des animaux. 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'antalgiques les plus adaptés à chaque procédure, optimiser les procédures, soulager le stress des animaux et leur fournir les meilleures conditions de vie tout au long du projet. Pour leur bien-être, les animaux vivent en groupe sociaux le plus longtemps possible. Leur isolement nécessaire à la protection des systèmes d'enregistrement sera limité au temps des procédures. Nous serons soucieux de palier à l'absence de contact direct par des contacts visuels et olfactifs. Ils auront à leur disposition des éléments d'enrichissement de leur milieu. L'ensemble des animaux est surveillé quotidiennement avec une surveillance renforcée après chirurgie, et durant les phases d'enregistrement du sommeil par vidéo tracking, accrue dès qu'un signe d'appel est constaté. Les chirurgies 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.

10423 L'infarctus du myocarde est un problème de santé public majeur dont la prévalence est estimée à 120 000 cas par an en France. Environ 10% des victimes décèdent dans l'heure qui suit et le taux de mortalité à un an est de 15%. C'est une maladie évolutive qui peut engendrer des arythmies et à terme une insuffisance cardiaque. Ceci correspond à l'incapacité du cœur à pomper suffisamment le sang pour répondre aux besoins de l'organisme. Un dysfonctionnement du myocarde entraîne des conséquences dramatiques qui affectent non seulement l'organe mais également les tissus périphériques et notamment les fonctions musculaires. L'objectif général du projet est de mieux comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la survenue des arythmies cardiaques lors d'un infarctus du myocarde. Ce projet vise à caractériser le rôle de la signalisation intracellulaire AMPc-Protéine Kinase A (PKA) dans la régulation de la survenue des arythmies cardiaques et la potentialité thérapeutique d'une modulation de celles-ci dans l'infarctus du myocarde. Le but de ces travaux est d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et de développer à plus long terme des thérapies nouvelles.

Nous avons déjà testé notre hypothèse dans des cultures primaires et souhaitons maintenant la valider dans des modèles physiopathologiques.

L'utilisation d'animaux est indispensable pour l'évaluation de la fonction cardiovasculaire et ne peut être remplacée par des cultures cellulaires (les cellules cardiaques ne se divisent pas). De plus l'évaluation de la fonction cardiaque est à réaliser sur l'animal entier adulte afin de s'approcher le plus possible de la pathologie humaine. Toutes les procédures de ce projet sont conçues pour respecter le principe éthique des 3R (Réduction, Raffinement, Remplacement) : (i) une planification minutieuse a permis de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en préservant la

validité statistique de l'étude, et en conservant une puissance statistique suffisante pour observer un effet, (ii) les fonctions cardiovasculaires sont étudiées par des méthodes non invasives permettant de limiter le nombre d'animaux, (iii) l'infarctus du myocarde sera induit en respectant au maximum les procédures de bien-être animal et en limitant la souffrance par le respect des méthodes anesthésiques et analgésiques, (iv) afin de minimiser encore le nombre d'animaux utilisés, en fin d'expérimentation les tissus prélevés sont partagés entre les domaines explorés. Les animaux seront surveillés quotidiennement et leur entretien sera effectué dans des conditions soigneusement contrôlées pour s'assurer qu'ils ne subissent aucun stress. Afin d'améliorer leurs conditions d'hébergement de l'enrichissement sera ajouté dans leurs cages. Un total de 200 rats seront nécessaires pour le projet.

10424 L'ocytocine (OT) est une molécule jouant un rôle clef dans de très nombreuses fonctions physiologiques, comme la régulation de la douleur, de la peur, ou les comportements sociaux, sexuels ou parentaux. Si ses effets généraux sont à présent bien documentés, les circuits et sous-populations neuronales à la base de ces différentes modulations restent encore inconnus. De même, comment les neurones OT sont activés/recrutés au cours de ces différentes situations comportementales est actuellement inconnu. L'une des limitations principales pour la recherche dans ce domaine est technique : comment accéder à ces neurones *in vivo*, alors qu'ils sont situés en profondeur dans le cerveau. Nous proposons, au travers de ce projet de mettre au point cette technologie de pointe afin de pouvoir dans un second temps caractériser les réactions des neurones OT lors de différentes situations comportementales.

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

Adéquation avec la règle des 3R.

Remplacer : Notre étude porte sur l'analyse de l'activité complexe de réseaux neuronaux. Il n'est donc pas possible, à ce jour, de remplacer l'usage d'animaux vivants.

Réduire : Compte tenu le caractère de mise au point et les difficultés d'ordre technique attendues, le nombre d'animaux (rats Wistar ; souris C57Bl6) a été réduit au strict nécessaire.

Raffiner : Les animaux seront hébergés - sauf exception mentionnée - de manière collective avec eau et nourriture *ad libitum*. Les cages sont enrichies avec du matériel de nidation (frisures) et des bâtons à ronger. Les animaux seront placés en cycle jour/nuit 12h/12h en condition de température et d'hygrométrie contrôlée. Bien que ce projet nécessite une approche invasive (implantation d'un microscope miniaturisé) le maximum sera fait pour réduire stress et douleur tout au long de l'expérience (animaux libre de leurs mouvements, anesthésie, traitements pré et post-opératoire analgésiques, suivi quotidiens de l'état général des animaux).

Nombre total d'animaux utilisés dans ce projet : 220

10425 La toxoplasmose est une parasitose dont la prévalence chez l'Homme, en France, est d'environ 40% dans la population générale. Il s'agit dans plus de 80% des cas d'une infection asymptomatique et bénigne. Plus rarement, cette infection peut revêtir un caractère de gravité. Ainsi, chez la femme enceinte, contexte dans lequel s'effectue ce projet, l'infection par ce parasite peut être responsable d'une toxoplasmose congénitale par atteinte du fœtus (transmission transplacentaire). La gravité de celle-ci est d'autant plus importante que l'infection survient précocement au cours de la grossesse. Le diagnostic de toxoplasmose congénitale réalisé à la naissance, repose sur la sérologie et l'analyse du placenta et du sang de cordon/sang de bébé. Le diagnostic de la toxoplasmose congénitale reste limité aux laboratoires spécialisés. Il nécessite dans le cas particulier du diagnostic prénatal (DPN), un agrément délivré par l'Agence de la Biomédecine. Seule l'identification formelle du parasite dans ces liquides biologiques, par biologie moléculaire (détection de l'ADN du parasite par PCR) et/ou par inoculation à la souris permettra de confirmer le diagnostic de toxoplasmose congénitale. Cette dernière constitue la méthode de référence, permettant également l'isolement de la souche du parasite, indispensable pour les études épidémiologiques. Le modèle murin, sensible à l'infection par le toxoplasme (parasite des animaux à sang chaud) est

donc approprié et le seul disponible. Dans le cadre du diagnostic de la toxoplasmose, l'expérimentation repose sur l'inoculation par voie intrapéritonéale à la souris, d'échantillons biologiques d'origine humaine issus de patients à risque de toxoplasmose congénitale (liquide amniotique, placenta ou sang de cordon/bébé). Dans le cadre de la recherche pour l'isolement et la collection des souches de toxoplasmes en vue de leur caractérisation phénotypique et génotypique, d'autres échantillons peuvent être inoculés. Le nombre de souris utilisées pour l'expérimentation est de 2 à 6 souris (lié à la nature et à la quantité d'échantillon biologique disponible). Une fois inoculées, les souris sont surveillées quotidiennement (points limites). L'infection par le toxoplasme, bénigne pour l'animal, sera affirmée par l'apparition d'anticorps spécifiques anti-Toxoplasmes, détectés sur une goutte de sang prélevée au niveau de la veine de la queue, un mois après inoculation. Dans de rares cas, l'infection peut être suspectée sur des signes d'infection précoce (poils hérissés, gonflement de l'abdomen). Tous les animaux (positifs ou négatifs pour la toxoplasmose) issus de l'expérimentation, font l'objet d'une euthanasie. Le nombre total d'animaux utilisés dans ce projet est d'environ 1200 souris par an en fonction du nombre de prélèvements à analyser. Enfin les souris sont surveillées quotidiennement et sont hébergées dans des cages de dimensions adaptées avec un enrichissement adéquat.

10426 Notre plateforme d'irradiation propose un service d'irradiation de rongeurs de laboratoire qui comprend la mise à disposition des équipements pour les utilisateurs autorisés ou la réalisation par le personnel de la plateforme, d'irradiations corps entier ou de zone ciblée selon les besoins du demandeur. Dans ce contexte, la plateforme peut accueillir temporairement des animaux extérieurs à l'établissement utilisateur dont elle dépend. Ces animaux sont inclus dans des demandes d'autorisation de projet rattachées aux établissements d'expérimentation dont dépend le concepteur du projet et demandeur de la prestation. Les chercheurs utilisent l'irradiation soit comme sujet d'étude direct pour comprendre les effets cellulaires et moléculaires des radiations ionisantes ou comme outil pour créer après transplantation cellulaire des modèles murins de cancers humains affectant les cellules sanguines. La technique de greffe de moelle osseuse est utilisée pour réduire le nombre d'animaux et amplifier les animaux modèles de formes tumorales complexes. Cette demande d'autorisation de projet a pour objectif d'autoriser uniquement les protocoles d'irradiation effectuées par la plateforme pour des utilisateurs extérieurs à l'établissement. La plateforme s'engage à réaliser les irradiations seulement si les animaux sont inclus dans une demande d'autorisation de projet qui a reçu un avis favorable de la part du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. Cette demande est formulée pour un nombre de 2000 souris sur 5 ans. La plateforme s'engage à référencer pour chaque demande les numéros d'autorisation des projets ainsi qu'à mettre en place un décompte des animaux irradiés pour le compte des utilisateurs extérieurs. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de leur présence sur la plateforme d'irradiation et le vétérinaire de notre installation sera prévenu dès le moindre signe de souffrance afin de mettre en place un traitement approprié.

10427 L'AVC artériel périnatal est la forme d'infarctus cérébral la plus fréquente chez les enfants pour lesquels il n'existe aucun traitement. Les lésions de la matière blanche cérébrale et les déficits moteurs et d'apprentissage sont caractéristiques des troubles neurodéveloppementaux. Le sexe est un facteur influençant le devenir à long terme des enfants, ce qui suggère la nécessité d'une thérapie adaptée au sexe de l'enfant. L'inflammation consécutive aux AVC périnataux associée à la grande vulnérabilité des cellules cérébrales en développement à ce stress inflammatoire participe à l'apparition des lésions cérébrales. En fonction du sexe, les microglies, chef d'orchestre de la neuro-inflammation, sont différentes en nombre, localisation et fonction dans le cerveau en développement. La réponse neuro-inflammatoire pourrait ainsi expliquer les différences de devenir entre les deux sexes. Malheureusement, aucune thérapie n'existe à ce jour. L'inhibition d'une enzyme, la poly (ADP-ribose) polymérase (PARP) entraîne une immunomodulation microgliale et des améliorations motrices et cognitives chez la femelle uniquement après une ischémie néonatale. Les objectifs de ce projet visent donc (1) à comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires à l'origine du dimorphisme sexuel et (2) à évaluer la connectivité corticale après l'inhibition de la PARP chez des animaux soumis à une ischémie néonatale. Pour cela, nous utiliserons un modèle

d'ischémie cérébrale néonatale qui repose sur l'occlusion permanente de l'artère cérébrale moyenne gauche chez le souriceau au jour 9 post-natal (P9). Les souriceaux P9 possèdent un stade du développement cérébral qui correspond à celui d'un bébé né à terme chez l'Homme. L'artère cérébrale moyenne correspond à l'artère sylvienne chez l'Homme, qui est la principale artère bouchée lors d'un AVC. Dans ce modèle largement utilisé, il sera étudié les modifications transcriptionnelles microgliales, oligodendrocytaires et endothéliales ainsi que la connectivité corticale en lien avec les déficits comportementaux observés au stade adulte. Les souris seront euthanasiées pour prélèvement du cerveau afin d'étudier les lésions. Le nombre de souris utilisées sera de 336. La bonne reproductibilité, le taux de mortalité (15%) et d'échec (15%) de ce modèle expérimental permettent de limiter le nombre d'animaux par groupe nécessaire à la réalisation d'analyses statistiques (analyse de variance ; analyses multivariées). Ces précisions sont issues de données antérieures obtenues avec ce modèle. Ce modèle d'ischémie cérébrale, qui repose sur l'occlusion permanente de l'artère cérébrale moyenne, est de sévérité modérée. Pour respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum. Raffinement : la mise en place de points limites ainsi que l'observation régulière du comportement des animaux permettront d'identifier et de limiter toute souffrance et douleur. Les procédures seront réalisées sous une anesthésie générale contrôlée et maîtrisée. La durée de la chirurgie et de la séparation maternelle n'excède pas 15 minutes, afin de limiter la souffrance. L'imagerie de la connectivité corticale sera réalisée sous anesthésie contrôlée et sous analgésie. Les animaux seront placés sur des couvertures chauffantes afin de contrôler leur température. Une partie des travaux de ce projet a déjà été réalisée in vitro sur des cultures cellulaires. Cependant, les mécanismes impliqués dans les handicaps acquis suite à un AVC mettent en jeu l'interaction de plusieurs types cellulaires au cours du développement cérébral qu'il est impossible de reproduire in vitro. Il est donc indispensable d'associer, aux études in vitro, des études chez l'animal entier. A terme, les résultats de ce projet permettront d'identifier les mécanismes moléculaires et cellulaires à l'origine du dimorphisme sexuel observé sur l'inflammation, les lésions et les déficits moteurs et cognitifs induits par une ischémie cérébrale néonatale et après l'inhibition de la PARP. Ils pourraient permettre le développement de nouveaux médicaments adaptés au sexe de l'enfant, afin de limiter les conséquences d'un AVC chez les bébés.

10428 Le sepsis est une affection médicale sérieuse caractérisée par des réponses inflammatoires systémiques dérégulées en réponse à une infection, conduisant à un dysfonctionnement d'organes, suivies d'une phase d'immunosuppression responsable d'une susceptibilité accrue au développement d'infections secondaires. Malgré les avancées réalisées dans la prise en charge précoce des patients (antibiotiques à large spectre, réanimation hémodynamique, etc.), le sepsis reste associé à un taux de mortalité très sévère dans les unités de soins intensifs (20-40% des patients septiques 28 jours après le sepsis et 50-70% dans les mois qui suivent) essentiellement dû à l'incapacité du système immunitaire du patient immunodéprimé à répondre contre les infections (nosocomiales et réactivations virales). Rétablir l'homéostasie du système immunitaire du patient septique représente donc un enjeu capital.

Le modèle animal est le seul modèle utilisable actuellement pour étudier le système immunitaire et reproduire la complexité de la dynamique du sepsis qui englobe à la fois des mécanismes hémodynamiques, biochimiques et immunologiques.

Différents modèles animaux ont été décrits pour étudier ce syndrome dont la dynamique reste encore complexe. Un modèle murin est particulièrement décrit pour reproduire le plus fidèlement possible les statuts immunologiques, hémodynamiques et biochimiques observés chez l'Homme. Il s'agit du modèle CLP, basé sur la ligature et la perforation du cæcum sans obstruer l'intestin des animaux. Ce modèle combine la nécrose tissulaire et le sepsis polymicrobien mimant fidèlement les ruptures d'appendice et les diverticulites perforées rencontrées chez l'Homme. De plus, il s'agit du seul modèle dans lequel coexistent les deux phases clés du sepsis : la phase inflammatoire dérégulée conduisant au dysfonctionnement d'organe(s) chez l'Homme, ainsi que la phase d'immunosuppression responsable d'une incidence accrue du développement d'infections secondaires, très fréquemment observées chez les patients en soins intensifs.

Cette étude vise à mettre en place le modèle CLP au sein de l'équipe comme première étape d'un programme visant à tester de nouveaux traitements dans cette indication. Pour ce faire, nous bénéficierons de l'expertise de collaborateurs externes qui maîtrisent déjà ce modèle dans leur laboratoire. Le statut immunodéprimé des animaux sera ensuite validé par la réalisation de tests immunologiques appropriés.

Règle des 3R : Le bien-être des animaux sera au cœur de nos préoccupations. Un entraînement intensif sur animaux morts aura lieu avant l'expérimentation sur animaux vivants sous anesthésie générale afin de maîtriser parfaitement les gestes chirurgicaux et de réduire ainsi le nombre d'animaux vivants utilisés. Les analgésiques appropriés seront utilisés avant, pendant et après la chirurgie. Les cages des animaux seront placées dans une armoire chauffante jusqu'au réveil des animaux, et des aliments et des blocs d'eau gélifiés seront déposés à différents endroits de la cage pour faciliter l'alimentation des souris. Pendant toute la durée de l'expérience, une surveillance des symptômes de mal-être sera réalisée notamment l'état de la cicatrice, le poids et l'activité motrice des animaux. Des points limites ont été définis afin de limiter au maximum la souffrance des animaux.

Ce projet inclura un maximum de 54 souris qui est le nombre minimum d'animaux nécessaire afin de pouvoir conclure sur la bonne reproduction du modèle.

10429 L'athérosclérose est une réponse inflammatoire chronique qui se produit au niveau de la paroi des vaisseaux sanguins. Les complications courantes des pathologies athérosclérotiques incluent le syndrome coronarien aigu (SCA), l'accident vasculaire cérébral (AVC) ischémique ou encore l'ischémie critique des membres inférieurs (ICMI). Ces manifestations sévères sont la conséquence d'une rupture de la plaque athérosclérotique, ce qui permet au sang circulant d'être directement mis en contact avec le collagène et le facteur tissulaire. Tandis que le facteur tissulaire constitue le déclencheur physiologique de la cascade de coagulation, le collagène est un puissant activateur des plaquettes. Ils contribuent donc tous deux à la formation d'un thrombus au site de rupture de la plaque. Le thrombus ainsi formé va provoquer une obstruction artérielle empêchant la libre circulation sanguine et conduisant aux pathologies cardiovasculaires précitées.

Certaines protéines contenues en grande quantité dans les plaquettes sont rapidement libérées lors du processus d'activation plaquettaire. En interagissant avec des récepteurs situés à la surface des cellules, ces protéines sont capables de stimuler l'agrégation plaquettaire.

L'objectif de ce projet de recherche est d'étudier le potentiel anti-thrombotique d'un nouvel agent médicamenteux ciblant l'une de ces interactions. Le potentiel anti-thrombotique de cette molécule sera dans un premier temps évalué dans un modèle murin de thrombose induite par voie chimique au niveau de l'artère mésentérique, avec un suivi de la formation du thrombus par microscopie intravitale. Ce modèle expérimental est déjà particulièrement reconnu pour sa pertinence dans l'élucidation des mécanismes conduisant à l'obstruction artérielle impliquant des acteurs moléculaires libérés dans la matrice extracellulaire. Une seconde procédure expérimentale (incluant les mêmes groupes) permettra dans un deuxième temps de déterminer si l'éventuel effet anti-thrombotique ainsi mis en évidence s'accompagne ou non d'une tendance au saignement, cet effet secondaire indésirable constituant en effet la principale limite des thérapies actuellement utilisées en clinique.

Pour chacune des 2 procédures, un nombre maximal de 10 souris par groupe (pour un total de trois groupes) sera considéré, y compris pour les contrôles en présence d'une molécule supposée inactive ou du solvant des molécules seules, en ne considérant par souci de reproductibilité que des souris mâles âgées de 8 semaines. Une étude pilote permettra de déterminer le nombre d'animaux nécessaire pour obtenir un résultat statistiquement significatif (cette étude préliminaire incluant au minimum 4 animaux dans chacun des 3 groupes).

Dans l'éventualité où ces expériences permettent de mettre en évidence un effet anti-thrombotique de la molécule testée (et uniquement dans ce cas), il conviendra de s'assurer de la spécificité de cet agent innovant vis-à-vis de sa cible moléculaire en reproduisant les mêmes procédures chez des souris possédant le même fond génétique mais délétées pour le gène codant pour la protéine ciblée (là-encore un nombre maximal de 10 souris par lot seront considérées, en ne considérant par souci de reproductibilité que des souris mâles âgées de 8 semaines – une étude préliminaire

permettra de déterminer le nombre d'animaux nécessaire pour obtenir un résultat statistiquement significatif). Au total, l'étude est donc susceptible d'inclure un nombre maximal de 120 souris.

La formation de thrombose artérielle est un phénomène complexe, multifactoriel, multicellulaire, nécessitant l'utilisation de modèles intégrés. Par ailleurs, aucun modèle de substitution n'existe pour mesurer l'effet d'une substance sur le prolongement du temps de saignement (seconde procédure). Les animaux seront anesthésiés durant toute la durée de l'expérience (sans réveil) de sorte à ce qu'aucune souffrance ne soit induite. Les conditions d'hébergement incluront les mesures de raffinement adéquates (activités des animaux) afin de limiter le stress des animaux.

La réalisation de ce projet pourrait mener à terme au développement de nouvelles stratégies de traitement des pathologies thrombotiques.

10430 Aujourd'hui, l'aquaculture continentale est en difficulté en raison, d'une part, d'une baisse de la production et de la consommation traditionnelle de truites arc-en-ciel et de carpes et d'autre part de la concurrence avec les produits d'importation (pangasius, carpes herbivores à l'avenir). La production intensive de sandre constitue une alternative crédible pour compenser ce déclin de l'aquaculture continentale. Il est donc important de renforcer la compétitivité des entreprises percicoles pour accroître et optimiser la production.

Le sandre (*Sander lucioperca* L.) fait partie des espèces de poissons d'eau douce à hautes valeurs commerciales. A l'étal, le prix est d'environ 30 euros/kg de filet frais, soit le triple de celui des salmonidés truite et saumon. Les poissons consommés proviennent majoritairement des pêcheries mais les prises ont diminué de façon drastique en raison de la surpêche, du déclin des stocks de poissons sauvages et des captures souvent très variables d'une année à l'autre. Au contraire, la demande des consommateurs pour ces espèces est croissante en raison d'une qualité de chair particulièrement appréciée. C'est pourquoi, en Europe notamment, le marché est loin d'être totalement couvert et les prix ont fortement augmenté. Par conséquent, le développement de la production de sandre en France constitue une réelle opportunité pour accroître la production française de ces espèces et répondre aux besoins du marché pour la consommation.

La production du sandre et le développement des entreprises concernées doivent obligatoirement s'accompagner d'une maîtrise du processus de domestication. Dans ce cadre, il est important de maîtriser la reproduction afin d'obtenir une production de juvéniles de qualité tout au long de l'année. Cette exigence implique l'obtention de gamètes et de larves en grand nombre et de grande qualité et une réduction de la variabilité des performances de reproduction encore actuellement observées. Mais des données antérieures chez les poissons montrent que les performances de reproduction sont très variables d'une population à une autre. Or, il existe deux populations disponibles en ce moment pour produire des sandres de façon intensive : une population hongroise et une population tchèque. Ce projet vise donc à comparer les performances de reproduction entre deux populations de sandres domestiqués.

Lors de cette expérimentation, les 2 populations de sandres seront soumis à un programme photo-thermo-période afin d'obtenir la maturation sexuelle. Juste avant l'ovulation, un nombre maximum de 15 femelles par population seront anesthésiées, un prélèvement d'ovocytes sera réalisé pour vérifier l'état de maturation (procédure 1), une suture de la papille génitale sera effectuée pour ne pas perdre la ponte (procédure 2) les œufs seront prélevés et fécondés par le sperme de mâles (procédure 3). Pour les deux populations, nous comparerons un certain nombre d'indices qui permettent d'évaluer les performances de reproduction : le poids de l'ovaire, le taux de fécondation, le taux d'éclosion ainsi que le taux de malformation chez les larves. 30 mâles sont disponibles pour obtenir du sperme. Soit un total de 60 poissons au maximum.

Le nombre de poissons par population a été calculé afin d'obtenir une puissance statistique suffisante mais aussi nécessaire pour espérer obtenir un résultat significatif tout en respectant la règle des 3R (réduction). Il n'est pas possible d'avoir recours à des modèles cellulaires ou moléculaires car la réponse globale de l'individu est nécessaire (remplacement non envisageable). 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 la moindre souffrance de l'animal déclenchera sa sortie de l'expérience (raffinement).

10431 L'hépatite fulminante aigue ou chronique est une pathologie mortelle dont la seule thérapie efficace est une greffe hépatique rapide. Malgré les progrès dans les domaines de la greffe, des traitements des greffons et de leur logistique, le nombre de patients qui décèdent en liste d'attente ne cesse d'augmenter. Il est donc fondamental de développer grâce à la bio-ingénierie des alternatives thérapeutiques. C'est dans cet axe que s'inscrivent les foies extracorporels.

Notre équipe, dans le cadre de deux consortiums successifs (incluant des différentes équipes de recherche, de cliniciens et des industriels) a mis au point un dispositif innovant. Celui-ci permet de traiter le sang du patient en séparant le plasma des éléments figurés (plasmaphérèse) et en le faisant circuler dans deux modules de détoxification (charbon actif et résine échangeuse d'ions) puis dans un bioréacteur contenant des cellules de foie (issues soit d'une lignée cellulaire ou de cellules souches) avant restitution.

De solides arguments prouvant la fonctionnalité de ces cellules ont été établis lors d'expérimentations in vitro. Avant de tester l'efficacité du dispositif sur un modèle d'insuffisance hépatique chez le rat, il est nécessaire de prouver son innocuité en faisant un essai de sécurité sur des animaux sains pour détecter d'éventuels effets indésirables. L'objectif de cette étude est donc de montrer que ce dispositif est sans danger, afin de pouvoir le tester sur des animaux malades pour évaluer son efficacité dans un essai ultérieur. Le modèle du rat a été choisi pour cette étude car c'est un modèle fréquemment utilisé dans la littérature internationale et sur lequel de nombreuses données sont disponibles.

Dans cet essai, des rats sains seront connectés au circuit extracorporel puis sacrifiés à différentes échéances pour analyser les effets de ce traitement sur des organes tels que le cœur, le foie, le cerveau, les reins, les poumons, la rate. Des dosages sanguins seront également effectués pour quantifier la présence de certaines toxines ou enzymes.

Les procédures mises en place nous permettront d'optimiser la règle des 3 R (remplacer, réduire, raffiner).

Remplacer

Un modèle animal vivant est nécessaire pour cette étude : en effet, une culture cellulaire ou des tranches de tissu ne permettraient pas une évaluation globale des effets systémiques du dispositif. Actuellement deux modèles animaux sont considérés comme relevant, le porc et le rat. Nous avons opté pour le modèle bien décrit rat Wistar 200g (remplacement partiel pour une espèce moins évoluée) car nous disposons grâce à des études similaires publiées d'une solide base scientifique et statistiques.

Réduire

Le nombre d'animaux a été déterminé de façon à utiliser le moins possible d'animaux tout en conservant une pertinence scientifique et statistique.

Raffiner

En vertu du principe de raffinement, les rats seront acclimatés à l'animalerie pendant une semaine avant le début des expérimentations. Ils seront soumis à un cycle jour-nuit de 2x12h et auront un accès libre à de la nourriture standard et de l'eau. En outre, leurs cages seront enrichies par l'ajout de papier cardé. Toutes les procédures seront effectuées avec l'objectif de maximiser le bien-être des animaux et de limiter la souffrance et la détresse. Si des signes visibles de souffrance apparaissent chez un rat avant la date prévue de l'expérience, il sera écarté définitivement de l'expérimentation sans attendre la fin de celle-ci.

50 rats Wistar d'environ 200g (Ce stade de développement correspond à un poids comparable à ce qui est décrit dans la littérature scientifique pour le modèle médicamenteux d'insuffisance hépatique aiguë) sont requis pour cette étude. Il s'agit du nombre minimum permettant de répartir les animaux dans les trois groupes d'intérêt (contrôle, dispositif sans cellules, dispositif avec cellules) et un groupe d'animaux supplémentaires en anticipation d'une éventuelle exclusion d'un ou plusieurs animaux des procédures expérimentales, afin d'obtenir des résultats suffisant pour montrer l'innocuité du dispositif.

10432 Nous nous intéressons à deux protéines de la même famille, la sialoprotéine osseuse (BSP) et l'ostéopontine (OPN), et à leurs rôles dans la biologie de l'os. Nous avons généré des souris qui n'expriment aucune de ces deux protéines (souris « double knockout (KO) »). Nous utiliserons des

souris sauvages, des souris simple KO pour BSP ou simple KO pour OPN, ainsi que des double KO, dans lesquelles nous aspirerons la moelle osseuse du fémur. Les étapes de la régénération de la moelle osseuse (avec formation rapide d'un os médullaire qui est ensuite résorbé) seront ensuite étudiées par diverses techniques d'imagerie quantitative et d'immunocytochimie. Le but de ce projet est d'analyser la complémentarité de fonction entre BSP et OPN dans la formation et le modelage de l'os, en particulier la cinétique de vascularisation, de formation osseuse et de minéralisation. Ce travail ne peut être réalisé que sur des organismes complets génétiquement modifiés, donc sur des souris. On utilisera au plus 180 animaux sur 4 ans, avec des groupes expérimentaux de 6 souris, conservées entre 3 et 8 jours après l'opération, minimum d'effectif et de temps nécessaire pour mettre en évidence les effets recherchés. Toutes les procédures d'analgésie et de suivi post-opératoire (points limites) seront appliquées pour minimiser la souffrance et l'inconfort des sujets expérimentaux.

10433 Le muscle strié squelettique est composé de fibres musculaires qui doivent s'adapter aux changements physiologiques et environnementaux tout au long de la vie. Il a aussi la capacité de régénérer complètement après une lésion, grâce à des cellules souches satellites. Les cellules satellites sont responsables de la régénération des fibres musculaires après une lésion, que celle-ci soit d'origine traumatique ou génétique (dystrophie musculaire). Des pathologies comme les myopathies, le vieillissement ou un exercice physique trop intense conduisent à un stade chronique d'activation de la régénération avec un épuisement des cellules satellites, aboutissant ainsi à une diminution de la capacité régénérative. Le projet vise à comprendre comment les cellules satellites répondent aux signaux d'activation lors de la régénération. L'identification de ces mécanismes de régulation pourrait permettre l'établissement de stratégies thérapeutiques afin d'améliorer la régénération musculaire dans des contextes pathologiques affectant le muscle.

Ce projet mobilisera 1773 souris. Une lésion musculaire locale sera réalisée après injection d'une toxine dans le muscle de la patte chez la souris anesthésiée. D'après nos études antérieures, les animaux présentent un comportement et une activité normale après l'injection dès leur réveil. La régénération musculaire sera étudiée dans plusieurs modèles de souris, ce qui permettra d'identifier le processus biologique mis en place pour cette régénération.

Les démarches mises en œuvre pour suivre les 3 R sont :

- Remplacement : des expériences dans les cellules ont déjà été réalisées, des résultats ont été obtenus et pour étudier la physiologie de la régénération musculaire nous devons utiliser l'animal entier.

- Réduction : nous utiliserons le nombre d'animaux minimal permettant d'obtenir des résultats statistiquement significatifs. De plus, des banques biologiques issues des expérimentations sont gérées de façon commune afin d'y recourir et limiter l'utilisation de nouveaux animaux. Elles permettent notamment les études histologiques et les cultures cellulaires pour plusieurs analyses différentes. Autant que faire se peut, des prélèvements multiples sont réalisés après euthanasie sur le même individu pour des tests parallèles.

- Raffinement : les protocoles les moins invasifs et les moins douloureux possibles sont privilégiés. Des anesthésiques sont utilisés pendant les expérimentations afin de réduire au maximum le stress et la souffrance des animaux. Des mesures sont prises pour améliorer les conditions d'élevage afin d'enrichir l'environnement des souris.

10434 L'infarctus du myocarde est une des premières causes de décès dans le monde. Sa prise en charge consiste en la reperfusion des artères obstruées. Une reperfusion précoce permet de diminuer la taille de l'infarctus et augmente considérablement la survie des patients atteints. Cependant, cette phase de reperfusion est elle-même à l'origine de lésions délétères, dites lésions de reperfusion. Les stratégies de cardioprotection visent à limiter la formation de ces lésions additionnelles pour diminuer de façon encore plus importante la taille de l'infarctus. Notre équipe s'intéresse particulièrement à l'utilisation de certains antithrombotiques au moment de la reperfusion. En effet, un des mécanismes mis en jeu dans la formation des lésions de reperfusion est l'activation de la coagulation. La formation de caillots est également en lien avec des phénomènes inflammatoires par le biais d'enzymes impliquées dans la cascade de la coagulation (sérines protéases), capables

d'activer des récepteurs générant des effets proinflammatoires. Ces liens entre inflammation et coagulation jouent un rôle important dans la formation des lésions de reperfusion. Ainsi, l'inhibition des sérines-protéases de la coagulation semble être une stratégie pertinente pour limiter les effets néfastes de la reperfusion. Le dabigatran est un inhibiteur direct de la thrombine. Notre équipe a déjà démontré l'effet cardioprotecteur de certains anticoagulants dans l'ischémie-reperfusion myocardique chez le rat. A l'aide de ce même modèle nous souhaitons étudier si le dabigatran possède également un effet cardioprotecteur. Nous voulons également préciser le mécanisme à l'origine de cet effet cardioprotecteur, en étudiant s'il a un effet anti-inflammatoire et/ou protecteur de l'endothélium. L'expérimentation animale est indispensable pour étudier les lésions d'ischémie-reperfusion myocardique, du fait de l'importance de la circulation sanguine dans les différents mécanismes impliqués. Seules les expériences indispensables seront réalisées. Il n'y aura pas de répétition inutile d'expérience. Les prélèvements d'organes seront optimisés afin de ne pas augmenter le nombre d'animaux nécessaires. En accord avec la règle des 3 R, et dans le but d'obtenir des résultats significatifs, nous utiliserons le moins de souris possible.

Nous appliquons la règle des 3 R :

REMPACER

Nous ne pouvons pas remplacer ce modèle par un modèle in vitro, car le remodelage vasculaire met en jeu le système immunitaire et hormonal.

REDUIRE

Nous réduisons au minimum le nombre d'animaux pour obtenir des résultats exploitables au niveau statistique. Une analyse statistique des résultats sera réalisée (analyse de variance ANOVA).

RAFFINER

Nous raffinons nos conditions d'expérimentation et d'hébergement pour le bien-être de nos animaux. Les animaux sont hébergés dans des cages aux normes (au minimum par 2 et au maximum par 4) suivant l'âge et le poids des animaux, de plus les cages sont enrichies par des jouets (rouleau sopalin, copeaux).

Les animaux sont surveillés au quotidien par le personnel de l'animalerie et le poids est suivi 2 fois par semaine.

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. Les animaux utilisés seront des rats Sprague-Dawley et le nombre d'animaux requis pour ce projet est de 245.

10435 Les anticorps sont des auxiliaires et des réactifs employés non seulement dans des procédés relatifs à la biochimie, la biologie moléculaire et l'immunohistochimie, mais aussi à des fins diagnostiques et thérapeutiques. Ce projet a pour but de fournir des anticorps mono et polyclonaux suite à l'injection d'ADN par voie intradermique (immunisation génétique) et/ou de protéines/peptides en sous-cutanée ou en intrapéritonéale (immunisation protéique/peptidique). Pour l'immunisation génétique, le plasmide contenant le gène d'intérêt est directement injecté chez l'animal qui va ensuite exprimer la protéine (antigène) in vivo, qui va induire une réaction immunitaire pour la production d'anticorps spécifiques. L'immunisation protéique/peptidique constitue une stratégie pertinente pour la génération d'anticorps dirigés contre des épitopes présélectionnés. Lors de la production d'anticorps, nous tirons parti de la réaction naturelle de défense de l'organisme contre des molécules étrangères. Ce projet pourra engendrer l'utilisation de 1500 rats et 700 souris sur 5 ans. L'utilisation d'animaux pour produire les anticorps d'intérêt est nécessaire car la mise au point des conditions de production in vitro est longue (plusieurs mois) et les rendements sont souvent inférieurs à ceux in vivo. Les développements nécessaires pour chaque production les rendent moins efficaces en termes de mise au point et ils ne sont guère compatibles avec certaines applications comme les screenings de molécules. Dans ce projet, le screening d'antigènes permet l'utilisation de petits groupes d'animaux de 3 à 10 par lot. Les animaux sont préparés selon la règle des 3R pour les principes de réduction et de raffinement. Les animaux sont hébergés en groupe dans des cages contenant de l'enrichissement. La manipulation des animaux est réalisée par le même personnel compétent dans la contention et la procédure d'immunisation pour limiter le stress induit par le protocole. Les points limites sont observés tout au long des procédures. Une surveillance des animaux est réalisée quotidiennement pour détecter et traiter éventuellement tout

signe de douleur. Tout animal qui présenterait une perte d'état général sévère sera euthanasié selon une méthode recommandée par la réglementation et approuvée par le comité d'éthique et la structure du bien-être animal.

10436 La Coqueluche est une pathologie des voies respiratoires causée par la bactérie *Bordetella pertussis*. Chez certains patients, les symptômes coquelucheux (fièvre, toux) peuvent évoluer vers une détresse respiratoire sévère voire le décès (195 000 décès par an). Cette pathologie touche en majorité les nourrissons et les jeunes enfants dont le système immunitaire est encore immature. Néanmoins aujourd'hui, les cas de coqueluche chez des enfants plus âgés voire des adultes sont de plus en plus fréquents. Depuis les années 1940-1950, des vaccins « ancienne génération » dit cellulaires ou à germe entier (wP) ont été mis au point pour l'immunisation des populations. Cependant, depuis les années 1990 et la crainte d'effets indésirables, des vaccins « nouvelle génération » dit acellulaires (aP, c'est-à-dire composé de protéines bactériennes inactivées) sont aujourd'hui utilisés dans la plupart des pays développés. Depuis ce changement vaccinal, une résurgence de cas de coqueluche a été détectée. Des études épidémiologiques, cliniques et précliniques ont montré que l'immunité diminue rapidement après vaccination contre la coqueluche et particulièrement avec les vaccins aP. Ces derniers protègent de la maladie mais pas de la colonisation bactérienne ou de la transmission.

L'objectif principal du projet est de caractériser la réponse immunitaire suite à la vaccination par les deux générations de vaccins de nouveau-nés pour mieux comprendre les changements observés dans l'épidémiologie de la coqueluche.

A ce jour, ces différents éléments ne peuvent pas être étudiés ni *in vitro* ni dans des modèles de petits animaux. Le primate non humain (PNH, espèce babouin olive) a été choisi afin d'avoir, d'une part, un modèle d'infection par la bactérie comparable à la maladie humaine et, d'autre part, une réponse vaccinale similaire à celle qui sera obtenue chez l'homme.

Le projet prévoit d'utiliser au maximum 120 animaux nés et élevés en captivité dans un établissement reconnu. Le nombre d'animaux dans chacun des groupes expérimentaux a été ramené au minimum nécessaire compatible avec l'utilisation de tests statistiques pour permettre l'interprétation des résultats. Des protocoles d'anesthésie, d'analgésie sont mis en place lors des méthodes expérimentales, toutes conçues pour éviter les souffrances lors des interventions sur les animaux (prélèvements de sang, de fluides et de biopsies, immunisations, infection expérimentale, imagerie sous anesthésie, limitation des volumes de sang prélevés). Une attention particulière est apportée à l'hébergement des animaux en groupe. Cependant, pour maîtriser les éventuelles surexpositions bactériennes et les contaminations croisées entre individus, l'hébergement individuel est nécessaire. Dans ce cas, les animaux sont en cage individuelle tout en permettant des interactions sociales et seront remis en groupe dès que possible.

Des critères d'arrêt sont prévus dans le projet 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.

10437 Le virus T lymphotrope humain de type 1 (HTLV-1) infecte les cellules immunitaires, notamment les lymphocytes T appelés CD4+, et induit leur prolifération. L'infection persiste à vie et entraîne, chez 2 à 5% des individus infectés, une prolifération maligne des lymphocytes appelée leucémie ou lymphome T de l'adulte (ATLL). La forme aiguë de ce cancer, la plus fréquente, est fatale avec une moyenne de survie de 6 mois. L'infection par ce virus peut aussi entraîner des pathologies inflammatoires du système nerveux central comme la paraparésie spastique tropicale. Dans le monde, au moins 5 à 10 millions d'individus sont infectés par HTLV-1, en particulier au Japon, en Afrique subsaharienne, et en Amérique latine et centrale. La transmission de ce virus a majoritairement lieu lors de l'allaitement maternel dans plusieurs zones d'endémie, et cette voie de transmission est fortement associée au risque de développer l'ATLL. Cependant, les mécanismes impliqués dans cette transmission sont encore méconnus. Des études épidémiologiques et génétiques ont démontré l'existence de facteurs génétiques favorisant la transmission du virus de

la mère à l'enfant. Les intestins sont un site probable d'entrée du virus dans l'organisme lors de l'allaitement, et notre laboratoire a débuté l'investigation des mécanismes de franchissement de la barrière intestinale par le virus HTLV-1. Cette étude a prouvé que le virus HTLV-1 est capable de traverser les cellules intestinales sans les infecter.

Notre projet vise à étudier différents facteurs physiologiques intestinaux des nourrissons pouvant favoriser leur infection par HTLV-1 lors de l'allaitement par une mère infectée : nous nous intéressons notamment à l'influence de la flore intestinale ou au rôle de certaines cellules de la barrière intestinale. Ces études nécessitent l'utilisation d'un modèle animal pour pouvoir identifier le rôle de ces facteurs à l'échelle de l'infection persistante d'un organisme.

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 la flore intestinale non plus.

Plusieurs publications ont montré la sensibilité à l'infection du souriceau par voie intrapéritonéale, et nos propres expériences dans le cadre d'un précédent projet ont montré l'infectabilité de ce modèle par voie orale.

Cependant, l'efficacité d'infection que nous avons obtenue est faible, et ce projet vise à optimiser les conditions d'infection de ce modèle afin de pouvoir tester, dans des conditions optimales, quels sont les facteurs physiologiques favorisant l'infection des nourrissons.

Cette optimisation sera réalisée en faisant varier la fréquence des infections (par gavage) et les lignées de souris infectées. Nous testerons 3 lignées de souris. Pour chacune, nous testerons 3 charges infectieuses différentes avec 2 fréquences de gavage pour chacune. 1 groupe de souris sera infecté par injection intrapéritonéale comme dans la littérature pour servir de contrôle positif d'infection.

Les données expérimentales précédentes (littérature ou laboratoire) indiquent que l'infection par HTLV-1 de la souris n'est accompagnée d'aucune pathologie ou souffrance associée. Cependant, parmi les lignées de souris testées dans ce projet pour leur sensibilité à l'infection se trouve une lignée dont le système immunitaire est partiellement compromis et sur laquelle les effets de l'infection n'ont jamais été rapportés, bien qu'improbables.

En termes de raffinement, les animaux infectés seront donc observés quotidiennement, tout signe de stress ou de souffrance sera immédiatement enregistré et l'animal concerné euthanasié.

Ce projet, prévu pour une durée de 5 ans, comprend 1 procédure avec un degré de sévérité modéré en raison de la fréquence des gavages (jusqu'à 5 gavages, tous les trois jours) pour certains groupes de souriceaux. Les groupes expérimentaux seront toujours et nécessairement constitués de portées de souriceaux, contenant un nombre moyen d'animaux évalué à 6. Ce nombre permettra l'obtention de résultats statistiquement significatifs.

Nombre total d'animaux : 324.

10438 Le rôle du microbiote sur le risque de surpoids a été révélé par la comparaison du microbiote de souris obèses à celui de souris saines. Alors qu'elles recevaient toutes le même régime identique, l'on a mis en évidence, d'une part, une différence de population bactérienne et, d'autre part, une augmentation de la masse grasse après conventionnalisation chez des souris initialement axéniques, et ce malgré une prise alimentaire faible.

L'implication de certaines populations bactériennes dans le risque de surpoids a été confirmée par des manipulations de transfert de microbiote fécal. Le transfert du microbiote de souris obèses a provoqué une prise de poids chez des souris axéniques. Le transfert du microbiote de souris obèses puis ayant maigri après une intervention de chirurgie bariatrique a été suivi d'une perte de poids chez des souris obèses non opérées. Chez l'homme, la transplantation du microbiote d'un donneur en bonne santé mais en surpoids s'est ensuivi d'une prise de poids chez le receveur. Enfin, le transfert de microbiote d'individus minces a provoqué une amélioration de la sensibilité à l'insuline chez des receveurs souffrant du syndrome métabolique.

Parmi les mécanismes pouvant expliquer l'effet du microbiote, l'on a notamment évoqué une meilleure extraction énergétique des aliments par absorption des acides gras à chaîne courte

(AGCC) issus de la fermentation colique ainsi que l'effet de ces derniers sur le métabolisme des adipocytes, après liaison à des récepteurs spécifiques. Le microbiote est, par ailleurs, impliqué dans la survenue des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin et dans l'instauration d'une inflammation systémique. Cet effet s'expliquerait par le rôle de certains microorganismes dans le maintien ou l'altération de l'intégrité de la barrière intestinale. Une modification du microbiote, en diminuant l'expression des protéines des jonctions serrées, augmenterait la perméabilité intestinale et rendrait ainsi possible le passage transpariétal de composants des parois bactériennes qui induiraient un processus inflammatoire subclinique responsables à son tour, d'une baisse de la sensibilité à l'insuline.

Le lien entre microbiote et sensibilité à l'insuline a été mis en évidence par l'amélioration de la sensibilité à l'insuline par transfert de microbiote d'individus maigres chez des receveurs souffrant du syndrome métabolique. Cette amélioration s'expliquerait par une activation du système nerveux para-sympathique par les AGCC, ce qui stimulerait la sécrétion d'insuline et initierait tant la prise de poids que la diminution de la sensibilité à l'insuline. Cette activation serait consécutive à la liaison des AGCC à des récepteurs présents à la surface des cellules endocrines intestinales qui sécrètent les incrétines qui ont notamment pour effet d'augmenter la réponse insulinaire au glucose, ce qui pourrait donc aussi participer à la baisse de la sensibilité à l'insuline.

Ces données permettent de poser l'hypothèse selon laquelle, puisque le microbiote intestinal peut influencer le métabolisme de l'hôte, sa modulation pourrait constituer un outil dans la prévention et le traitement du surpoids voire de l'obésité.

Dans ce projet, nous proposons d'étudier l'effet de différents régimes sur le microbiote, l'installation de l'obésité et les perturbations métaboliques associées chez le chien.

Dans un premier temps, nous envisageons d'étudier les effets d'un régime hyperlipidique administré à un niveau excédentaire par rapport aux besoins d'entretien sur la cinétique d'apparition de différents paramètres (modifications de la physiologie de l'hôte systémiques ou modification de la réponse à différents tests de stimulation, modifications du microbiote et de son métagénome).

Dans les étapes ultérieures du développement de notre projet, nous envisageons des interventions nutritionnelles visant à contrecarrer les effets d'un régime hyperlipidique et à améliorer la santé de l'hôte pour notamment étudier le rôle que jouerait le microbiote dans la réponse globale de l'organisme à ces interventions.

Un des objets de la première étape, que concerne la présente saisine, est donc aussi de confirmer la pertinence des mesures qui pourraient être effectuées dans les projets ultérieurs ainsi que de confirmer que la durée envisagée pour l'exposition au régime (8 semaines), déterminée sur la base de la bibliographie, est, chez le chien aussi, suffisante pour que ses répercussions soient significatives.

La physiologie de l'hôte sera appréciée par la détermination de facteurs systémiques (poids et composition corporelle, déterminants de la prise alimentaire, inflammation), de facteurs associés à l'épithélium intestinal, de la réponse de l'organisme à des stimulations exogènes (challenge tests). A partir de selles fraîches, seront déterminées les caractéristiques de population bactérienne et de son métagénome ainsi que son activité fermentaire.

L'étude sera menée sur 24 chiens, répartis en trois groupes de 8, qui auront précédemment tous consommé le même régime (aliment d'entretien, à un niveau d'apport d'entretien) et qui, pour la durée de l'étude consommeront tous un aliment hyperlipidique (et hyperénergétique). Huit chiens le recevront à un niveau correspondant à l'entretien, les autres à un niveau excédentaire. On aura séparé ces seize animaux en deux groupes pour pouvoir étudier l'évolution de l'ensemble des variables d'intérêt sans effet cumulatif sur un même animal.

Ce projet respecte la règle des 3R

Remplacer : Aucune manipulation in vitro ne permet de mesurer l'influence du régime sur le microbiote fécal, et sur la physiologie de l'hôte

Réduire : l'étude est organisée en carré Latin, ce réduit le nombre d'animaux et permet une analyse statistique compte-tenu des variations interindividuelles importantes

Raffiner : le bien-être des animaux sera surveillé par leur observation quotidienne. Les conditions d'hébergement et les méthodes expérimentales sont adaptées pour ne pas l'altérer. Pendant les procédures expérimentales, l'analgésie est assurée par la méthadone ; sont mesurées en

permanence les fréquences cardiaque et respiratoire, la saturation en O₂ dans le sang, la pression artérielle par Doppler et la température ; les animaux sont installés sur un tapis chauffant

10439 Il est parfois nécessaire de localiser les zones inflammatoires chez les patients, notamment dans les maladies inflammatoires chroniques (polyarthrite rhumatoïde, sarcoïdose, maladies inflammatoires chroniques intestinales, etc.). A cet effet, l'imagerie par scintigraphie a montré son intérêt, en particulier la scintigraphie au FDG (18Ffluorodésoxyglucose), qui permet de visualiser le métabolisme glucidique : ceci repose sur le fait que les sites d'inflammation sont denses en cellules ayant un métabolisme glucidique accru.

L'athérosclérose est également une maladie inflammatoire chronique. Cette affection est extrêmement courante et peut conduire à des complications graves (accidents vasculaires cérébraux, infarctus du myocarde). Dans cette affection, la visualisation de l'inflammation dans les artères pourrait permettre de guider le traitement et de prévenir les complications. La scintigraphie au FDG est d'ores et déjà en cours d'évaluation pour détecter les plaques instables (zones d'inflammation) sur les artères du cou (et donc évaluer le risque d'accident vasculaire cérébral). La scintigraphie au FDG présente toutefois, dans ce contexte, une limite principale : le métabolisme glucidique n'est pas spécifique de l'inflammation. Ainsi, la fixation physiologique du cerveau et du myocarde, qui sont de grands consommateurs de glucose, peut gêner l'interprétation.

Nous souhaitons développer un nouvel outil d'imagerie de l'inflammation, basé sur un peptide capable de se lier aux cellules en conditions inflammatoires. Alors que le FDG cible non spécifiquement toutes les cellules exerçant une activité métabolique intense (dont le cerveau, le myocarde.), le peptide CD31 ne se lie qu'à certains types cellulaires, lorsqu'elles ont été activées : cellules endothéliales, leucocytes et plaquettes. Le peptide devrait donc permettre de marquer avec plus de précision des sites inflammatoires associant inflammation des vaisseaux et des leucocytes, comme par exemple dans l'athérosclérose, mais également tous les sites où des leucocytes activés sont recrutés, comme les sites infectieux, avec moins de bruit de fond que la scintigraphie au FDG car seules les cellules activées par l'inflammation sont ciblées, et non pas toutes les cellules métaboliquement actives.

Notre but est ici d'établir, dans un modèle préclinique in vivo, la preuve de concept que ce peptide permet de détecter des sites d'inflammation par scintigraphie. Nous nous placerons pour cela dans un modèle d'inflammation aigüe induite par injection intramusculaire d'huile de turpentine chez le rat, un modèle bien établi dans la littérature.

Pour l'ensemble des expériences, nous prévoyons d'utiliser 21 rats, pour une durée de 2 ans, en respectant le principe des 3R. Remplacement : des tests in vitro ont déjà permis d'établir que le peptide se fixait aux cellules en conditions inflammatoires, il est désormais nécessaire de le tester in vivo chez l'animal. Réduction : l'utilisation de contrôles internes à chaque rat (comparaison dans un même animal de la radioactivité dans le site inflammatoire et dans un site contrôle), permettront de diminuer le nombre d'animaux nécessaires. Raffinement : le personnel est très compétent et les animaux sont maintenus sans isolement, avec enrichissement, avec une surveillance scrupuleuse de l'état de santé des rats par les opérateurs et les responsables du bien-être animal en plus des soins standards. Les rats recevant une injection d'huile de turpentine seront examinés tous les jours afin de détecter une douleur éventuelle. Les expériences d'imagerie seront réalisées sous anesthésie, avec confort thermique et monitoring du rythme respiratoire.

10440 La Dysplasie broncho-pulmonaire (DBP) est la plus fréquente des maladies respiratoires de l'enfant prématuré marquée principalement par une altération du développement alvéolaire. Cela conduit à un déficit du nombre d'alvéoles (hypoalvéolisation) et un élargissement des espaces alvéolaires avec pour conséquences une réduction de la surface des échanges gazeux. Cette maladie présente des conséquences fonctionnelles et morphologiques à l'âge adulte, et elle est aujourd'hui considérée comme un déterminant précoce des maladies respiratoires de l'adulte, dont la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO). Les résultats actuels de l'équipe suggèrent que la délétion du facteur de transcription p16 pourrait permettre de rétablir les capacités

d'alvéolisation du poumon après une agression néonatale. Cette capacité de récupération peut résulter d'une régénération accrue en l'absence de p16.

La DBP et la BPCO partagent des anomalies anatomiques avec un élargissement des espaces aériens à l'origine d'une insuffisance respiratoire. Elles partagent aussi des mécanismes communs et mieux comprendre l'une permet d'émettre des hypothèses pour mieux comprendre l'autre maladie. De plus, la DBP est considérée comme un déterminant précoce de la BPCO. La pneumonectomie permet d'étudier l'alvéologénèse et nous faisons l'hypothèse que cette alvéologénèse est altérée dans la DBP et l'emphysème. Montrer que la délétion de p16 est associée à une augmentation de l'alvéologénèse dans ces deux modèles sera un argument fort pour dire qu'envisager p16 comme une cible thérapeutique dans ces deux maladies.

Les tests in vitro restent limités pour comprendre les mécanismes d'alvéolisation et de croissance pulmonaire. Le modèle de pneumonectomie chez la souris est un modèle qui permet d'évaluer les capacités du poumon à croître et à produire rapidement de nouvelles alvéoles. On parle de régénération pulmonaire.

L'objectif de ce projet est donc de déterminer 1) si l'exposition à l'hyperoxie en post natal (modèle murin de dysplasie bronchopulmonaire chez le souriceau) diminuent à l'âge adulte les capacités de croissance du poumon controlatéral suite à une pneumonectomie 2) si la délétion de p16 prévient ce phénomène 3) si ce processus est aussi présent après une agression à l'âge adulte en déterminant si l'instillation d'élastase à l'âge adulte et l'emphysème qu'elle induit sont associés à une diminution des capacités de croissance du poumon controlatéral suite à une pneumonectomie et si la délétion de p16 prévient ce phénomène. Un total de 8 souris par groupe (soit 256 animaux) est nécessaire pour ce projet.

Cette demande d'autorisation fait suite à une demande précédente acceptée, dans laquelle sont utilisés les modèles de DBP induit par l'hyperoxie en post natal et d'emphysème induit par l'élastase. Nous avons cherché à réduire au maximum le nombre d'animaux en expérimentation étant donné l'effet attendu. Dans certaines procédures, les animaux seront traités avec des antidouleurs. Ces animaux seront hébergés dans des cages ventilées individuellement en permanence et seront enrichies par des maisonnettes. Elles seront sous surveillance régulière afin de vérifier des signes de souffrance comme la perte de poids.

10441 Formation d'un groupe de 6 étudiants à l'électrophysiologie visuelle et l'imagerie rétinienne sur modèle murin.

Le modèle animal ne peut pas être entièrement remplacé, car les modèles artificiels ne rendent pas compte des modalités du vivant (ex parasitage électrique, température corporelle).

Le nombre d'animaux est réduit, deux séries d'expériences vont être conduites, un animal pour les examens électriques et un animal pour l'imagerie : une souris pour 6 étudiants et par manipulation avec une souris « remplaçante » en cas de décès prématuré ou anomalie oculaire non détectée, soit un total de 4 animaux.

Les animaux auront une période d'acclimatation d'une semaine, les cages seront enrichies, seront transportées jusqu'à la salle de travaux pratiques dans des boîtes hermétiques avec leurs litières. Les souris seront anesthésiées par injection intrapéritonéale d'un mélange Ketamine/Xylazine. Il n'y a pas de suivi car les animaux sont euthanasiés immédiatement après l'expérimentation.

10442 La dégénérescence rétinienne (DR) est à la base de nombreuses maladies oculaires humaines qui mènent inexorablement vers un handicap visuel permanent, voire une cécité totale. Les trois maladies les plus importantes en termes de nombre de personnes affectées sont le glaucome, la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) et la rétinopathie diabétique (RD). Ensemble, elles touchent environ 200 millions de personnes à travers le monde. Les trois sont en constante augmentation, et restent sans remède. Leurs origines sont à la fois génétiques et environnementales. Les souffrances occasionnées aux patients ainsi que les coûts médicaux générés ont fait de la santé visuelle un enjeu crucial pour la société. Bien que de nombreux modèles animaux soient disponibles, notre compréhension des mécanismes conduisant au déficit visuel reste limitée. Ceci est au moins en partie dû au fait que ces modèles, rats et souris transgéniques ou non, sont des rongeurs nocturnes dont les rétines ne contiennent que très peu de cônes (<3%).

Or c'est la perte des cônes, responsables de la vision de jour, de l'acuité visuelle et de la sensibilité chromatique chez l'homme, qui conduit inexorablement à un handicap visuel sévère, tel qu'observé dans la DMLA et la RD. Notre but est de mieux comprendre les causes cellulaires et moléculaires, et les conséquences structurelles et fonctionnelles, des atteintes de ces photorécepteurs dans les maladies comme la DMLA ou la RD. Nous allons mener nos recherches chez des espèces diurnes « exotiques » telles que le Rat du Nil (*Arvicanthis ansorgei*) et le Rat des Sables (*Psammomys obesus*), deux espèces possédant une rétine riche en cônes, proche de la macula humaine. Le Rat du Nil constitue un modèle de choix pour mieux comprendre la physiopathologie des cônes, y compris dans les maladies telles que la DMLA. Le Rat des Sables représente un très bon modèle animal du diabète de type II, ouvrant ainsi la possibilité d'étudier la RD.

Le nombre d'animaux nécessaires durant les 3 années du projet est de 162 individus au total : 40 *Arvicanthis* pour l'étude de la maladie de Stargardt (une forme de DMLA d'origine génétique) et 122 *Psammomys* pour la rétinopathie diabétique, en respectant la règle des 3 R :

1. « Réduire » : nous analyserons des sous-groupes (définis par traitement, par âge) de $n=10$, nombre nécessaire pour pouvoir valider les résultats avec une puissance statistique satisfaisante;
2. « Raffiner » : les espèces ont été choisies en fonction de leur pertinence pour fournir un maximum d'informations et de modéliser le plus fidèlement possible la vision centrale humaine. Les animaux seront hébergés en cages enrichies avec du matériel de nidation et des bâtons à ronger. Un suivi régulier est mis en place pour détecter toute apparition de points limites.
3. « Remplacer » : il s'agit ici d'expériences réalisées sur le système visuel dans son intégralité, de la détection de la lumière jusqu'aux réponses fonctionnelles et comportementales. La complexité de ces réseaux rend impossible l'utilisation de modèles *in vitro* qui ne peuvent refléter l'ensemble des interactions entre cellules/organes.

La DMLA sera modélisée par une approche génétique (inactivation locale d'un gène), la DR par une approche « environnementale » (alimentation enrichie). La présente demande vient en complément d'un projet récemment accepté, décrivant les deux nouveaux modèles de maladie humaine et leur suivi par électrorétinographie et analyses moléculaires. Il s'agit ici de compléter ces approches par des techniques d'imagerie non invasives, équivalentes de celles pratiquées lors du diagnostic chez l'homme : examen du fond d'œil, angiographie (visualisation du réseau des vaisseaux sanguins), tomographie par cohérence optique (OCT, permettant de voir en 3D la structure de la rétine). Une anesthésie légère sera utilisée, pour permettre l'immobilité des yeux au cours de l'examen.

10443 Parmi les progrès dans le domaine de la médecine vétérinaire, le développement de techniques diagnostiques et thérapeutiques non invasives tient une place prépondérante.

Disposer d'outils qui permettent de préciser le diagnostic sans causer de stress et de douleur surajoutée au cheval permet d'affiner la prescription thérapeutique, de mieux suivre l'évolution de l'affection et, somme toute, concourt à la guérison de l'animal tout en limitant l'atteinte de son bien-être voire même en le favorisant. Avoir des outils de diagnostic sur les fonctions internes de l'organisme comme l'électro-encéphalographie (EEG) en apposant un casque sur la tête de l'animal sans avoir à planter des aiguilles à travers la peau permet d'étudier le comportement et la réponse de l'animal à l'administration de traitement, tout en le gardant dans un environnement et des conditions au plus proche du naturel, et ainsi de récolter des informations encore plus pertinentes. Dans la phase thérapeutique, disposer de traitements efficaces ayant peu d'effets secondaires est aussi un objectif incontournable pour promouvoir la guérison et le bien-être du cheval.

Dans ce cadre, un casque d'EEG pour cheval, connecté en bluetooth à un ordinateur, a récemment été développé avec le but de pouvoir étudier les ondes électriques du cerveau en relation avec le stress et la douleur. Dans un premier temps, pour comparer les acquisitions obtenues avec ce dispositif aux EEG classiquement obtenus avec la mise en place d'électrodes à travers la peau voire la boîte crânienne (données déjà publiées), les EEG obtenus avant et après administration de médicaments utilisés en anesthésie chez 10 juments seront étudiés.

Dans un deuxième protocole, la physiothérapie est de plus en plus utilisée chez les animaux pour la gestion de la douleur et la rééducation fonctionnelle en sus des traitements médicamenteux avec le but d'améliorer plus rapidement et plus efficacement le retour à la fonction normale. Des

techniques de stimulation neuromusculaire utilisées chez l'homme ont été transposées chez le cheval mais manquent de données précises concernant leur adaptation à la musculature du cheval. En particulier, la stimulation neuromusculaire (de type « sport-élec ») est intéressante à utiliser lors de tramas nerveux et/ou musculaires situés au niveau de l'épaule, de l'encolure et de l'arrière-main du cheval. L'étude vise à préciser l'emplacement des pads à poser sur la peau sur les muscles de l'épaule, de l'encolure et de l'arrière-main pour obtenir la meilleure contraction musculaire possible tout en ayant la meilleure tolérance du cheval.

Dans le cadre des 3Rs :

Remplacer : Il n'existe pas de modèle in-vitro permettant de répondre aux questions expérimentales posées, l'organisme en entier étant nécessaire pour évaluer la réponse recherchée.

Réduire : Le nombre d'animaux est réduit à un total de 10 pour pouvoir réaliser des statistiques et parer aux différences individuelles.

Raffiner : Afin de réduire le stress, les chevaux resteront sous surveillance au box le temps nécessaire à la disparition des effets des traitements, seront manipulés 2 par 2 et par un animalier expérimenté. Entre les phases d'expérimentation, les chevaux sont gardés en pâturage dans un environnement naturel protégé.

L'ensemble des examens et procédures sera réalisé dans un environnement sécurisé, calme et adapté par des opérateurs expérimentés. Les chevaux bénéficieront d'un animalier dédié pour les soins quotidiens et des activités d'interaction homme-cheval basées sur le principe de « renforcement positif » entre les phases d'expérimentation.

Un suivi clinique quotidien sera réalisé avec recherche de la présence de douleur. Un traitement analgésique sera instauré au besoin.

Le couchage et le réveil de l'anesthésie seront gérés par un vétérinaire anesthésiste spécialiste dans un box capitonné construit à cet effet. Si des complications surviennent au réveil, elles seront prises en charge immédiatement à l'aide d'un traitement approprié dans les standards de la pratique équine actuelle.

10444 La maladie de Huntington est une maladie neurodégénérative héréditaire rare (environ 6000 personnes atteintes en France) très invalidante. Malgré d'importants efforts de recherche, il n'existe encore aujourd'hui aucun traitement capable de combattre de façon efficace la progression de cette maladie. De nouvelles approches thérapeutiques sont essentielles pour mieux prendre en charge les malades.

De nombreuses observations ont révélé une association entre une quantité élevée de cholestérol dans le cerveau et l'apparition de certaines maladies neurodégénératives. Or, le cholestérol est incapable de traverser la barrière hémato-encéphalique et reste confiné dans le cerveau. Il ne peut en sortir qu'après avoir été transformé en l'un de ses dérivés par l'enzyme CYP46A1. Parmi les approches thérapeutiques les plus prometteuses pour certaines maladies neurodégénératives se trouvent les thérapies géniques qui visent à produire une grande quantité de CYP46A1 dans le cerveau pour y diminuer la quantité de cholestérol. Elles consistent à introduire dans les cellules du cerveau le gène codant CYP46A1 grâce à un vecteur viral, c'est-à-dire un virus qui n'a plus de pouvoir pathogène.

Nous avons déjà la preuve de concept de cette stratégie dans des modèles murins pour les maladies neurodégénératives suivantes :

-la maladie d'Alzheimer : la surexpression de CYP46A1 dans les régions précocement atteintes par la pathologie chez des souris modèles permet de restaurer les déficits de la mémoire ;

-la maladie de Huntington : La surexpression de cette même enzyme permet de corriger les atteintes des neurones au niveau du cerveau ainsi que les atteintes comportementales chez la souris modèle.

Le projet consiste à tester l'effet de la surexpression de l'enzyme CYP46A1 dans la maladie d'Huntington (MH) au moyen de différents vecteurs viraux ciblant distinctement différents types cellulaires du système nerveux (neurones, astrocytes, oligodendrocytes) et de voir s'il peut être bénéfique de cibler en même temps des types cellulaires différents. L'objectif à moyen terme est un premier essai de thérapie génique par administration de vecteur dans le striatum de patients atteints de la maladie de Huntington.

Le recours aux modèles animaux est nécessaire car aucun type de culture cellulaire ou système synthétique ne permet à ce jour de reproduire la complexité architecturale des cellules du cerveau, en particulier leurs interactions structurelles et fonctionnelles, et donc de mesurer les effets de la thérapie à l'échelle de l'organe entier. Il existe déjà des modèles de souris Huntington bien caractérisées. Ils seront utilisés pour cette étude. Pour chaque vecteur testé, l'efficacité de transfert du gène CYP46A1, le niveau de production de la protéine, de sa diffusion et leurs conséquences au niveau cellulaire seront testés chez des souris modèles de la maladie. Des tests comportementaux seront également réalisés. Tous les vecteurs utilisés seront caractérisés *in vitro* avant leur utilisation chez l'animal. Les animaux utilisés dans le cadre de ce projet sont nés et élevés en captivité dans des élevages agréés.

Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie, réalisés au moment des injections de vecteur notamment, 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.

Le nombre d'animaux utilisés (135) a été restreint au minimum indispensable de façon à obtenir des données statistiquement pertinentes pour valider l'efficacité de la stratégie thérapeutique développée.

10445 L'objectif de ce projet est d'évaluer l'effet anti-inflammatoire de l'enoxolone (acide 18beta-glycyrrhétinique) appliqué par voie cutanée dans un modèle murin d'œdème à l'oreille. Ce projet se déroule dans le cadre de la formation des étudiants de 5e année de Pharmacie suivant la filière industrie, à qui il est proposé de réaliser le « Common technical Document » (CTD) d'un médicament, ici l'enoxolone formulé en crème. Le dossier CTD regroupe toutes les études réalisées par un laboratoire en vue d'obtenir une autorisation de mise sur le marché, c'est un document central dans l'élaboration du médicament. L'objet de la présente demande consiste à autoriser l'évaluation pharmacologique de l'enoxolone dans un modèle *in vivo* d'inflammation (œdème à l'oreille). Les résultats scientifiques obtenus seront versés au dossier CTD monté par les étudiants. L'enoxolone est utilisé en thérapeutique en occident par voie topique dans diverses affections cutanées (irritations de la peau et des muqueuses) et en médecine traditionnelle chinoise sous forme de plante. Il y a de nombreuses études dans la littérature pointant un effet anti-inflammatoire *in vitro* sur lesquelles s'appuie cette demande, mais peu de données sont publiées sur un effet bénéfique *in vivo*. Cette étude, dans le cadre d'une formation universitaire, apportera donc un éclairage scientifique original et pertinent sur la molécule d'enoxolone. Nous prévoyons d'utiliser au maximum 30 souris pour la durée du projet (une seule procédure). En accord avec la règle des 3R, nous avons réduit le nombre d'animaux au minimum, dans le modèle que nous souhaitons développer, chaque animal est son propre témoin, ce qui réduit le nombre de lots nécessaires. Le raffinement est assuré par un enrichissement de confort et de stimulation pour les animaux hébergés. Des points limites sont également définis pour éviter toute souffrance potentielle. Afin de réduire le stress et améliorer le bien-être des animaux pendant l'expérimentation (stress généré par la mesure de l'épaisseur de l'oreille), les souris sont sédâtées par l'administration de benzodiazépine avant le début de la manipulation. Enfin, il n'existe pas de modèle alternatif permettant d'évaluer l'effet anti-inflammatoire d'un produit appliqué en topique, le modèle animal n'est donc pas remplaçable. Le test statistique utilisé sera un test non paramétrique de comparaison de moyenne pour échantillon apparié de type test de Friedman.

10446 A l'heure actuelle, les techniques de dosage basées sur l'utilisation d'anticorps polyclonaux ou monoclonaux sont très couramment appliquées dans les laboratoires que ce soit d'analyses médicales ou de recherche.

Dans le cadre de l'obtention du DUT génie biologique, il est indispensable que les étudiants reçoivent une formation théorique et pratique sur la préparation (purification) et l'utilisation des anticorps polyclonaux comme outils de dosage et de diagnostic (immuno-techniques). En parallèle,

ils ont l'occasion en 2ème année de réaliser la culture d'hybridomes et donc la production d'anticorps monoclonaux.

Afin de pouvoir se familiariser avec les différentes facettes du travail au laboratoire avec des anticorps polyclonaux, les étudiants réalisent durant leurs 2 années de formation ces différents travaux pratiques :

-Purification et quantification d'anticorps spécifiques à partir d'un immun-sérum (précipitation au sulfate d'ammonium et chromatographie d'affinité)

-Mise au point des dosages de la Serum albumin bovine (SAB) par néphélométrie et par ELISA en compétition et comparaison des 2 méthodes

-Dosage de la microalbuminurie par néphélométrie lors de l'analyse des conséquences des diabètes sucrés.

-Dosage des anticorps spécifiques anti-SAB par ELISA en sandwich et par réaction d'immuno diffusion (IDR)

Pour pouvoir réaliser l'ensemble de ces travaux pratiques il faut environ 180 mL d'immunsérum de lapins. Ainsi, pour obtenir ce sérum, l'immunisation est réalisée sur un nombre de 8 lapins par campagne d'immunisation. Au maximum, seront effectuées 3 campagnes d'immunisation sur les 5 ans, soit 24 Lapins.

Dans le respect de la règle des 3R, il n'est pas possible d'obtenir des anticorps polyclonaux par une méthode substitutive. Concernant le nombre d'animaux, il est restreint au minimum possible et il doit permettre de prélever un volume de sang et d'immunsérum suffisant pour pouvoir effectuer les travaux pratiques ci-dessus. En terme de raffinement, les conditions d'hébergement, de traitement (tranquillisation, anesthésie générale et points limites) et de prélèvement des animaux (sous anesthésie générale) seront adaptées afin de d'éviter toute douleur ou souffrance.

10447 Ce projet se propose de développer un nouveau dispositif médical implantable permettant la délivrance de molécules de façon contrôlée et avec une meilleure précision. L'application principale visée est le glioblastome, grade de tumeur cérébrale le plus agressif dont le pronostic est très mauvais, et pour lequel il existe peu de solution thérapeutique. Due à sa localisation et à des caractéristiques biologiques propres (barrière hématoencéphalique) de nombreuses solutions thérapeutiques ne peuvent être utilisées. Grâce à ce nouveau dispositif, ces solutions pourraient être à nouveau envisagées. Le recours à des modèles animaux permet une évaluation dans une situation de microenvironnement complexe et d'étudier la diffusion in vivo des composés délivrés par le dispositif. Un maximum de 380 rats pourra être inclus dans ce projet pour répondre aux problématiques explorées. 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. Ce projet s'inscrit dans une démarche éthique appliquée à l'expérimentation animale en respectant la « règle des 3R », une attention particulière étant portée au maintien en normothermie des animaux à chaque phase, y compris lors de la chirurgie et de l'examen en Imagerie par Résonance Magnétique par l'utilisation de tapis chauffant. Toutes les procédures sont réalisées sous anesthésie générale. Les animaux reçoivent un antidouleur et un anti-inflammatoire avant et après la procédure de chirurgie. Un protocole d'antalgie est appliqué pendant 3j après la chirurgie (anti inflammatoire dans l'eau de boisson et anti douleur). Des expérimentations in-vitro en amont permettront de réduire le nombre de groupes et par voie de conséquence le nombre d'animaux, en évaluant les capacités de diffusion du dispositif sur un gel d'agarose mimant le parenchyme cérébral. 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.

10448 Parmi les axes de recherche actuels ciblant le cancer, l'immuno-thérapie est extrêmement porteuse et présente une efficacité marquée sur certains types de tumeurs. Notre partenaire développe de nouveaux candidats immunothérapeutiques. Ce projet a pour but de mettre en évidence les effets thérapeutiques de traitements viraux sur des animaux porteurs de tumeurs cutanées.

Il s'inscrit dans le domaine de la recherche préclinique, avec pour but de développer de nouveaux traitements contre certaines tumeurs.

Chaque protocole utilisera un maximum de 150 (10 groupes de 15 animaux) souris afin de tester l'efficacité de différents nouveaux candidats thérapeutiques sur le développement d'une lignée tumorale greffées au niveau cutané.

Chaque groupe expérimental recevra le traitement, et sera composé de 15 animaux afin de mettre en évidence l'efficacité d'un traitement permettant de traiter la tumeur.

Les cellules tumorales seront injectées par voie sous-cutanée au niveau du flanc.

Le protocole consistera à mettre en évidence sur des souris porteuses de tumeurs l'effet thérapeutique de traitements. La présence, la taille, la forme et l'évolution des tumeurs ainsi que l'état de santé et le poids des animaux constituent des indicateurs pertinents pour définir l'efficacité de ces traitements.

Raffinement :

Les animaux seront observés quotidiennement pour s'assurer que leur état de santé n'est pas détérioré, et pesés 2 fois par semaine. Les tumeurs seront aussi palpées (pour détecter leur présence précoce) puis mesurées deux fois par semaines.

Les points limites d'euthanasie pour raison éthique seront liés à la taille des tumeurs, à leur masse relative au poids de l'animal et à l'état de santé afin d'éviter une souffrance de l'animal.

Réduction :

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. 15 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.

Ce type de protocole pourra être répété 12 fois par an selon le développement de nouveaux candidats thérapeutiques. Le nombre de groupe dans un projet pourra être réduit. Néanmoins, en considérant 12 projets par an utilisant un maximum de 150 animaux chacun sur une durée de 5 ans, le maximum théorique d'animaux utilisés dans le cadre de ce projet est de 9000 animaux. Cela constitue bien sur un effectif théorique maximal et tous les efforts possibles seront faits pour limiter le nombre d'animaux utilisés.

Remplacement :

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.

10449 La listériose humaine est une maladie invasive d'origine alimentaire due au pathogène *Listeria monocytogenes* (Lm). Bien que les infections soient rares parmi la population générale, Lm est à l'origine d'infections sévères chez les femmes enceintes, les nourrissons, les personnes âgées et les personnes immunodéprimées et constitue l'une des bactéries les plus létales au sein de ces populations. Les premiers symptômes étant bénins et non spécifiques, le diagnostic de la listériose est difficile. Une femme enceinte peut être asymptomatique même si le fœtus est mortellement infecté. Par conséquent, la vaccination contre Lm apparaît comme une mesure de prévention des plus intéressantes pour lutter contre ce pathogène mortel. Actuellement, aucun vaccin n'est disponible pour prévenir les infections à *Listeria*. Le but du projet est d'évaluer dans un organisme complexe, la réaction immunitaire de plusieurs candidats vaccins. Une première étape *in silico* a permis de mettre en place les paramètres nécessaires à ces traitements. Suite au criblage *in vitro* effectué, nous avons pu isoler plusieurs candidats disposant d'un potentiel suffisamment intéressant pour qu'il soit testé chez l'animal.

Remplacement : Nous utiliserons des souris comme modèle, qui auront été humanisées, c'est à dire qu'elles seront porteuses des marqueurs humains ciblés par le traitement au lieu des équivalents murins. Nous avons exploité autant que possible les méthodes alternatives, mais

devons désormais travailler avec un système immunitaire au sein d'un organisme pour valider les effets attendus. Seul un modèle animal permet à l'heure actuelle d'effectuer ce type de protocole. Afin de renforcer la réaction immunitaire, les candidats vaccins seront injectés avec un adjuvant, c'est à dire une molécule qui entraîne une stimulation additionnelle du système immunitaire au site d'injection.

Une première étape consistera en une évaluation de plusieurs candidats regroupés en une seule injection, afin de limiter le nombre d'animaux utilisés. Ensuite, selon les réponses immunitaires, nous envisagerons des analyses ciblées sur les candidats déclenchant une réponse appropriée.

Réduction : Un total de 40 animaux sera nécessaire pour la réalisation de l'ensemble de ce projet, à raison de 5 animaux par groupe, en incluant un reliquat si cela s'avère nécessaire pour une raison technique. Cet effectif, en accord avec les prérequis éthiques de réduction, nous permettra d'obtenir une puissance d'analyse suffisante dans les expérimentations qui seront réalisées. En effet, il s'agira notamment d'étudier l'impact de ces immunisations sur le sang et la rate des souris étudiées.

Raffinement : Les molécules injectées dans ce projet ont été identifiées par des procédés *in silico* et *in vitro*, et ont été testées chez l'animal dans une première étude faite par un partenaire. Aucune toxicité ou effet secondaire indésirable n'a été trouvé lors de ces tests. Les animaux seront hébergés en groupes, avec un enrichissement. Ils seront surveillés quotidiennement (points limites) et auront de l'eau et de la nourriture à disposition.

10450 Le travail de notre compagnie est principalement axé sur les maladies génétiques rares affectant les muscles. Notre but est de caractériser des modèles vivants, animaux, de maladies musculaires humaines et de tester l'éventuelle amélioration des signes de la maladie grâce à différentes thérapies. Nous nous intéressons en particulier aux myopathies centronucléaires qui touchent une naissance sur 50 000 dans le monde et peuvent déboucher sur une perte de la marche, et parfois sur une incapacité respiratoire associée au décès précoce lors de l'enfance. Nous avons précédemment montré qu'un niveau trop élevé de la dynamine 2 (DNM2) dans le muscle semblait jouer un rôle majeur dans la survenue de certaines de ces myopathies. Nous avons donc développé une thérapie utilisant un composé injectable capable de diminuer le niveau de dynamine 2. Chez des souris malades et injectées avec ce composé, nous avons observé un rétablissement quasi-total sur l'ensemble des signes cliniques de la maladie, et un allongement de leur durée de vie. Nous souhaitons maintenant réaliser une étude des potentiels effets indésirables liés à l'utilisation répétée de ce composé injectable dans un autre modèle de souris jeunes plus adapté à ce type d'étude. Cette étude est indispensable et requise par les autorités réglementaires, avant de pouvoir tester cette thérapie chez les enfants atteints de ces myopathies lors d'essais cliniques prévus au premier trimestre 2019.

La grande similarité entre le fonctionnement des organes de la souris et ceux de l'homme en fait un modèle idéal pour tester les potentiels effets indésirables de nos thérapies dans un modèle vivant. Les tissus et organes de ces souris seront aussi utilisés pour des expériences ultérieures *in vitro* (REPLACEMENT). Plusieurs procédures expérimentales (maximum une par jour) seront réalisées chez les mêmes souris, pour réduire le nombre total de souris (REDUCTION). Ainsi, un maximum de 140 souris sera utilisé pour ce projet. 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).

10451 Le but de ce projet est d'étudier le rôle d'un gène identifié par l'un de nos partenaires comme étant une cible d'intérêt dans le traitement des maladies métaboliques liée à la régulation des graisses et des sucres, telles que le diabète.

De premiers résultats ont mis en évidence un rôle intéressant de cette cible dans un modèle Souris. Nous souhaiterions désormais l'étudier dans un modèle Rat disposant d'une mutation pour ce gène. En effet, le fond génétique des animaux présente une importance marquée dans ce type d'étude et nous souhaitons confirmer les résultats obtenus précédemment.

Pour cela, nous prévoyons d'utiliser 40 animaux qui seront nourris avec un régime enrichi en graisse et en sucre puis suivi durant plusieurs mois. Durant ce laps de temps, l'évolution du poids sera enregistrée, et plusieurs procédures expérimentales seront utilisées pour déterminer les capacités des animaux à répondre de manière appropriée à des apports glucidiques ou à un traitement à l'insuline. Ces 40 animaux sont répartis en 10 animaux par sexe et par génotype (contrôle ou mutant).

Ce type de régime enrichi déclenche chez des animaux contrôles une résistance à l'insuline, une prise de poids massive ainsi qu'une stéatose hépatique. Nous chercherons à déterminer si les animaux ne présentant pas le gène d'intérêt ont une réponse différente au régime enrichi, pour connaître son implication dans les boucles de régulation.

Réduction : 10 animaux par groupe expérimental seront utilisés. Cela constitue un effectif suffisant pour déterminer de manière statistiquement significative si les réponses obtenues chez les animaux génétiquement modifiés sont différentes de celles des animaux contrôles. Nous avons comme but d'employer le moins d'animaux possibles pour des raisons éthiques tout en permettant une interprétation scientifique des résultats. Pour cela, nous déployons un enchaînement de tests sur les mêmes animaux, en respectant un écart de deux semaines entre chaque procédure.

Raffinement : les animaux seront maintenus dans des conditions régulées de lumière et d'environnement, avec eau et nourriture à volonté. Un suivi quotidien des animaux sera effectué et tout signe de baisse de l'état de santé de l'animal sera suivi, à l'aide d'une grille d'évaluation dédiée à cet effet. En cas de niveau de souffrance non éthiquement acceptable, une euthanasie pour raison éthique des animaux sera effectuée. Néanmoins, la durée du protocole sur moins de 30 semaines ne présente pas de risque d'atteindre ce type de point limite.

Remplacement : Le gène d'intérêt a été identifié et validé au préalable *in silico* et de premiers résultats ont été trouvés dans un modèle murin. Nous cherchons à les confirmer dans un modèle Rat afin d'étayer les résultats obtenus, notamment du fait de la variabilité de ce type de réponse liée au fond génétique.

L'ensemble de ce projet utilisera des animaux mâles et femelles provenant d'une animalerie agréée.

10452 La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative, première cause de démence au monde. Au niveau cérébral, elle se caractérise, entre autres, par une accumulation progressive du peptide amyloïde- β ($A\beta$) formant les plaques amyloïdes. L' $A\beta$ est issu d'une protéine précurseur appelé APP (pour β -amyloid precursor protein). En effet, l'APP peut être coupée en différents fragments parmi lesquels l' $A\beta$, on parle de clivage. L'APP est retrouvée chez le Rat et son clivage peut également conduire à la production d'un peptide $A\beta$ mais celui-ci ne forme pas de plaque. Cela résulte principalement de la différence de 3 acides aminés dans la séquence du peptide $A\beta$, entre l'Homme et le Rat qui modifie les propriétés d'agrégation de l' $A\beta$. Au lieu de surexprimer massivement une forme humaine dans le cerveau du rat nous avons modifié la séquence de l' $A\beta$ du Rat pour la rendre identique à l'Homme. Cette nouvelle version humanisée du gène App nous permettra d'avoir un modèle plus proche de la maladie humaine. Nous proposons dans notre projet d'étudier l'impact de cette humanisation sur l'apparition de dépôts amyloïdes dans le cerveau.

Réduction :

Tenant compte du principe de réduction, nous utiliserons un nombre minimal d'animaux (45) estimé pour avoir des résultats scientifiquement interprétables. Dans le but d'utiliser l'ensemble des animaux produits et comme aucune différence particulière n'est attendue entre les mâles et les femelles, les deux sexes pourront être utilisés indifféremment.

Raffinement :

Aucune douleur n'est attendue. En effet, ces animaux ne feront l'objet que d'une seule procédure réalisée sous anesthésie générale. Par ailleurs, tout au long de leur vie, les animaux seront hébergés par deux et disposeront de dispositif d'enrichissement. Ils seront suivis quotidiennement, si un animal présente des signes de douleur ou de mal-être, il sera présenté au vétérinaire puis, si un traitement est envisageable, il sera mis en place. Dans le cas contraire l'animal sera euthanasié.

Remplacement :

Il n'existe à l'heure actuelle pas d'alternative à l'utilisation des animaux pour les études concernant le cerveau. En effet, il n'existe pas encore de modèle in vitro ou autre permettant de réaliser de la recherche fondamentale dans ce domaine.

10453 Le projet de l'équipe est de comprendre les mécanismes des désordres mentaux associés à des modifications de l'ADN conduisant à des déficiences intellectuelles ou à des troubles du spectre autistique (comme la réduction de l'interaction sociale, des déficits de la communication verbale et non verbale, ainsi que des comportements et activités répétitifs et restreints).

Dans ce projet, nous nous intéressons aux interactions sociales de différentes lignées de souris porteuses de conditions génétiques conduisant à des troubles du spectre autistique (TSA). Ces études n'ont jamais été conduites avec ce nouveau dispositif expérimental qui permet des études de plusieurs individus (4-6) en groupe social. Les différents modèles nous permettront de voir si les troubles de comportement social sont partagés ou spécifiques des différentes atteintes génétiques. L'aspect quantitatif devrait nous permettre ensuite de tester des drogues pour diminuer les TSA.

Une série de tests de comportement portant sur les traits des malades porteurs du syndrome humain sera réalisée grâce à des techniques nécessitant l'implant d'une puce RFID pour identifier les individus dans des groupes sociaux.

Ces puces RFID sont couramment utilisées pour identifier les animaux de compagnie comme les chiens et les chats. Ici bien sûr la taille est adaptée à la souris.

Remplacement : Nous utilisons la souris en tant que modèle de ces maladies génétiques rares car nous disposons de nombreux outils pour modéliser les défauts génétiques causant ces pathologies. De plus, les anomalies à observer (déficits cognitifs ou sociaux) nécessitent un modèle vivant suffisamment proche de l'homme pour avoir des tests comportementaux qui peuvent être transposés à celui-ci. Le modèle souris est donc la meilleure option ici.

Raffinement : Les premiers tests commenceront vers l'âge de 12-13 semaines. L'ensemble des tests comportementaux n'entraîne pas de stress ou souffrance sévère pour l'animal et les animaux feront l'objet d'un suivi permettant de s'assurer de leur bien-être et de leur santé au quotidien. Les animaux présentant des signes de douleur seront euthanasiés car inaptes à une étude comportementale.

Réduction : 16 individus mutants et 16 individus contrôles (32 souris) sont requis pour obtenir une puissance statistique suffisante afin de conclure à un phénotype ou non. Une deuxième cohorte d'animaux est requise afin de répéter les tests dans lesquels un phénotype a été vu afin de valider ce phénotype. Nous comptons étudier 3 fonds génétiques de références et 9 lignées génétiquement altérées pour des maladies humaines avec des traits autistiques. Ces études concernent un maximum de 1536 souris.

Avec un tel dispositif nous sommes en mesure de RAFFINER nos études expérimentales tout en réduisant le nombre d'animaux utilisés, dans l'esprit de la règle des 3'Rs.

Ces études vont nous permettre de déterminer si des altérations du comportement social sont détectables dans les modèles de maladies humaines présentant des traits du spectre autistique et potentiellement ouvrir sur des essais thérapeutiques.

10454 Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est la 2ème cause de mort par cancer dans le monde et le seul cancer à ne pas avoir régressé ces dernières années en terme d'incidence et de mortalité. Le CHC représente un problème majeur de santé publique pour lequel les options thérapeutiques sont limitées : bien que les tumeurs à un stade précoce puissent être traitées de façon curative en utilisant des approches chirurgicales, elles sont souvent diagnostiquées à un stade avancé, où les patients ne peuvent bénéficier que d'une option palliative. Ainsi, une thérapie qui soit bien tolérée, peu coûteuse et qui présente un ratio bénéfice-risque acceptable fait défaut.

Récemment, nous avons développé un anticorps monoclonal dirigé contre une protéine de jonctions serrées (Claudine-1). Cet anticorps monoclonal anti-Claudine 1 (CLDN1) n'a montré aucune toxicité et s'est montré très efficace in vitro pour induire une réponse de bon pronostic et in vivo pour prévenir le cancer dans un modèle souris de carcinome hépatocellulaire. Afin de valider ces résultats, nous souhaitons tester cet anticorps dans un modèle de souris greffées avec des cellules de CHC humain car les modèles murins non humanisés de CHC ne présentent pas complètement

le même profil de maladie que le CHC observé chez l'humain. L'injection de l'anticorps anti-CLDN1 nous permettra de vérifier son potentiel thérapeutique sur le CHC humain.

Notre projet vise donc à élaborer des thérapies innovantes du CHC grâce à l'utilisation d'un anticorps monoclonal anti-claudine 1.

La présente demande d'autorisation concerne l'utilisation de modèles humanisés de CHC, basés sur la greffe de cellules tumorales humaines dans des souris immunodéficientes. Des tumeurs primaires issues de patients ayant subi une résection chirurgicale seront greffées en situation orthotopique (c'est-à-dire dans le foie de souris immunodéficientes). Ensuite, un traitement avec l'anticorps monoclonal anti-CLDN1 sera effectué pour évaluer son efficacité sur ces modèles.

L'expérimentation animale est nécessaire pour évaluer l'efficacité de cet anticorps sur une tumeur vascularisée de dérivation humaine, impossible à reproduire in vitro.

Pour cette étude nous estimons le nombre d'animaux nécessaire à 130. Ce nombre d'animaux comprend les animaux reproducteurs et prend en compte le taux de réussite des greffes de tumeurs issues de patients. Afin de remplacer et de réduire au maximum le nombre d'animaux requis la majorité des expériences ont été menées en amont, in vitro sur des lignées cellulaires et ex vivo sur des biopsies de patients atteints de maladie hépatique (virus hépatite C, virus hépatite B, cirrhose, stéatose hépatique non alcoolique...), in vivo dans d'autres modèles murins de maladies hépatiques afin de nous assurer de la réelle nécessité de poursuivre sur ces modèles animaux. Afin de raffiner au mieux les expérimentations, le protocole expérimental est planifié en amont, l'environnement des animaux est enrichi, les souris greffées auront un suivi quotidien adapté afin d'éviter toute souffrance liée au développement du cancer (antalgie systématique) et ne seront jamais maintenues seules en cage. Tous les moyens nécessaires seront mis en œuvre pour éviter tout stress ou douleurs lors des procédures (anesthésie, imagerie non invasive), si besoin un analgésique dont la durée d'action s'étend au-delà de 24h est utilisé, des points limites que sont l'apparition de signes de mal être et de douleur, persistant au-delà de 48h suite à l'injection d'un analgésique sont appliqués et une méthode d'euthanasie appropriée est utilisée. Les données obtenues sur les animaux seront analysées avec des tests statistiques classiques adaptés type ANOVA, t-test, Mann-Whitney.

10455 Les pathologies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité et le vieillissement de la population en accroît l'importance. De plus, des pathologies comme l'hypertension artérielle, le diabète ou les pathologies ischémiques (coronariennes, cérébrales, rénales ou périphériques) surviennent d'autant plus fréquemment que l'âge des sujets avance. De manière générale les femmes sont moins atteintes de maladies cardiovasculaires que les hommes mais cette tendance s'inverse après la ménopause laissant penser à un rapport de cause à effet entre la production d'hormones féminines (œstrogènes) et une protection des accidents vasculaires. Au laboratoire depuis plusieurs années nous nous intéressons au rôle du récepteur aux œstrogènes dans la fonction vasculaire. Nous avons découvert que le remodelage aux flux dépend de l'activation des récepteurs alpha (ERα) des estrogènes. Nous aimerions comprendre le rôle du récepteur membranaire Eralpha dans la réactivité vasculaire ainsi que dans le remodelage artériel en réponse aux modifications de flux et/ou de pression artérielle. Cet aspect sera étudié plus en détail par l'utilisation d'un modèle de souris Knock out pour ERalpha, souris Er alpha -/- et leur contrôle Er alpha +/-+. Ce projet nécessitera l'utilisation de 1520 animaux au maximum. Nous appliquons la règle des 3R. Toutes les procédures chirurgicales seront accompagnées d'une analgésie pré et postopératoire (injection de Buprénorphine). Nous avons choisi d'administrer une seule dose de buprénorphine en pré-opératoire car nos chirurgies sont assez courtes (15 à 20 min). Une deuxième dose est faite 4h après la première. Cependant, pendant les premières 48h, en cas de souffrance de l'animal (prostration, agressivité, anorexie...), une nouvelle injection d'analgésie est réalisée. L'animal est anesthésié dans une chambre à induction chauffée, avec de l'isoflurane puis à la fin de l'opération l'animal sera placé sur un tapis chauffant. A la fin de la procédure les souris sont placées dans une enceinte de réveil et maintenues à 37°C jusqu'au réveil. Elles seront surveillées de manière rapprochée jusqu'à leur réveil (surveillance continue pendant les 30 premières minutes puis toutes les 15 minutes jusqu'au réveil).

L'animal sera suivi au réveil et dans les premières heures suivant l'opération, puis quotidiennement. Une grille de score pour l'évaluation de la douleur sera utilisée avec détermination du point limite. Nous ne pouvons pas remplacer ce modèle par un modèle in vitro, car le remodelage vasculaire met en jeu le système immunitaire et hormonal. Nous réduisons au minimum le nombre d'animaux pour obtenir des résultats exploitables au niveau statistique. Nous utiliserons le test de student et des tests d'Anova deux voies Avec post-test de Bonferroni.

Nous raffinons nos conditions d'expérimentation et d'hébergement pour le bien-être de nos animaux. Les animaux sont hébergés dans des cages aux normes (au minimum par 2 et au maximum par 4) suivant l'âge et le poids des animaux de plus les cages sont enrichies par des jouets.

Les animaux sont surveillés quotidiennement par le personnel de l'animalerie et le poids est suivi pendant au moins 4 jours grâce à la grille de point limite annexe 2, une nouvelle dose de buprénorphine est injectée à 2 mg/kg.

Ainsi, ces différents outils, pharmacologiques et moléculaires, devraient nous permettre de comprendre les fonctions vasoactives des œstrogènes et de tester des solutions thérapeutiques nouvelles.

10456 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.

Caractériser les effets des anticorps anti-plaquettes permettrait de mieux comprendre les processus immuns liés à la transfusion chez l'homme et d'améliorer par conséquent la prise en charge des patients en état réfractaire.

Bénéfices attendus : Ces expériences permettront de comprendre les mécanismes d'action des anticorps anti-plaquettes et ainsi de participer au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques dans le cadre des patients en état réfractaire et /ou dans les thrombopénies immunes (c'est à dire une diminution de la quantité de plaquettes circulantes due à la présence d'anticorps anti-plaquettes)

La compréhension de tels mécanismes nécessite d'étudier in vivo le devenir des plaquettes transfusées dans une souris alloimmunisée. Un modèle animal d'alloimmunisation déjà mis en place au laboratoire sera utilisé : des souris de fond génétique BALB/c recevront plusieurs injections hebdomadaires de plaquettes provenant de souris C57BL/6J afin de conduire à la production d'allo-anticorps (des anticorps dirigés contre des antigènes d'un individu différent mais d'une même espèce). D'autre part, des souris de fond génétique BALB/c ou de fond génétique C57Bl/6J recevront des injections de plasmas contenant des allo-anticorps plaquettaires ou une concentration donnée d'anticorps anti-CMH I (complexe majeur d'histocompatibilité, un ensemble de molécules propres à chaque individu). La quantité de plaquettes circulantes sera évaluée à différents temps après les injections d'anticorps, le lieu d'élimination des plaquettes pourra être évalué soit en histologie (prélèvement de différents organes à un temps donné après injection de l'anticorps rate, foie, poumon, moelle) soit grâce à un bio-imageur qui permet de visualiser en temps réel le lieu de séquestration et d'élimination des plaquettes ciblées par les anticorps anti-CMH I.

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.

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 et des anticorps monoclonaux anti-CMH I sera par exemple testé sur des plaquettes sanguines ex vivo 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. Les gestes nécessaires aux différents prélèvements sont très bien maîtrisés au laboratoire et sont donc réalisés très rapidement.

Ce projet nécessitera au maximum 483 souris.

10457 L'accident vasculaire cérébral (AVC) est la 3ème cause mortalité et la première cause de handicap acquis chez l'adulte dans les pays industrialisés 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 aiguë de l'infarctus cérébral est réalisée 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.

L'objectif de ce projet est de tester une stratégie afin d'évaluer la récupération sensorielle et cognitive après un AVC. Pour cela, cette stratégie thérapeutique sera étudiée à l'aide d'un modèle d'infarctus cérébral qui reproduit au mieux la physiopathologie de l'AVC, pour lequel un caillot sanguin est directement produit dans la lumière artérielle. Cette étude sera réalisée chez la souris du fait que ce modèle a été développé et très bien caractérisé dans cette espèce. Les procédures seront organisées afin que toutes les manipulations douloureuses soient réalisées sous anesthésie générale. Le suivi de la reperfusion tissulaire ainsi que de la récupération sensorielle sera réalisé dans 4 conditions différentes sur 22 animaux par groupes. Soit un total de 88 souris pour l'étude complète.

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. Un modèle in vivo est indispensable afin de pouvoir vérifier les effets sur le capteur sensoriel et la récupération cognitive. 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 le potentiel effet neuro-protecteur de notre stratégie thérapeutique. Notre projet correspond à l'étape de validation in vivo qui fait suite aux validations réalisées in vitro, et ne nous permet pas d'utiliser d'autres moyens que de tester notre modèle chez l'animal. Les données de la littérature utilisant ce modèle ainsi qu'une étude de puissance statistique en amont, permet de nous assurer que nous utilisons le nombre minimal d'animaux pour pouvoir conclure d'un effet de notre stratégie thérapeutique. 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. De plus, des signes de complications post-chirurgie sont définis pour éviter toute souffrance. Les principes éthiques et les standards de raffinement sont utilisés jusqu'à l'euthanasie de l'animal.

10458 Ce projet technique de transgénèse permet de générer de nouvelles lignées de souris génétiquement modifiées pour différentes équipes de recherche dans le cadre d'études portant sur le contrôle de la réponse immune des lymphocytes B et du développement des lymphomes. Ces modèles in vivo sont indispensables pour une compréhension globale des systèmes complexes et multi-localisés tel que le système immunitaire. Les études in vitro utilisant des lignées cellulaires ou des études in silico ne peuvent pas remplacer l'animal pour ces études car elles ne permettent pas de retranscrire toutes les interactions existantes au sein du système immunitaire et entre le système immunitaire et d'autres systèmes physiologiques. Les modifications génétiques permettent de mieux comprendre le rôle d'un gène en particulier dans le développement normal et tumoral du système immunitaire B ce qui peut donner des pistes d'intervention thérapeutique innovante pour les lymphomes. Les souris sont utilisées pour ces études car leur génome (ensemble de leurs gènes) et leur système immunitaire est proche de celui de l'Homme. Les nouvelles lignées sont créées par transgénèse c'est-à-dire l'injection, dans des blastocystes (un des premiers stades embryonnaires contenant une centaine de cellules), de cellules souches embryonnaires génétiquement modifiées puis l'injection des blastocystes modifiés dans l'utérus de femelles préparées hormonalement pour une gestation (femelles dites pseudo-gestantes). Après la naissance, la modification génétique est vérifiée sur un prélèvement de tissu d'1 mm. La technique de transgénèse a largement été développée chez la souris et est simple à mettre en œuvre ; les étapes nécessaires à sa réalisation ont été optimisées par un personnel technique qualifié et sont actuellement bien maîtrisées ce qui permet de réduire le nombre d'animaux au strict minimum pour assurer la réussite de la transgénèse. Les animaux sont hébergés dans des conditions strictement régulées et surveillées afin d'assurer le respect de leur bien-être (température et hygrométrie régulées, enrichissement systématique du milieu, change régulier, nourriture et eau ad libitum, surveillance quotidienne des conditions d'hébergement et de l'état général des animaux). De plus le transfert d'embryon (injection des embryons dans l'utérus) est réalisé sous anesthésie avec un suivi post opératoire permettant de vérifier que le réveil se passe bien et qu'il n'y a pas de souffrance post opératoire dans les jours qui suivent. Le prélèvement de tissu sur les animaux se fait sous anesthésie gazeuse. Sur les 5 ans que dure ce projet, il est prévu de créer 18 nouvelles lignées par an nécessitant 1450 animaux sur la durée du projet.

10459 Ce projet a pour but d'explorer la communication entre des structures clés des processus mnésiques pendant l'établissement de différents types de mémoires : mémoire de travail, mémoire de référence spatiale et mémoire émotionnelle. Cette communication sera établie en analysant des paramètres électrophysiologiques (oscillations cérébrales telles que les rythmes thêta et gamma), enregistrés grâce à des électrodes d'enregistrement des potentiels de champ locaux (PCL), et en effectuant des analyses de corrélation entre les activités des différentes structures. Ces enregistrements et ces analyses seront donc effectués avant, afin d'établir une activité basale, et pendant des tests comportementaux explorant la mémoire de travail à l'aide du labyrinthe radial, la mémoire de référence spatiale à l'aide de la reconnaissance d'objet en champ ouvert, et la mémoire émotionnelle à l'aide du conditionnement de peur. Ainsi, lors des tests comportementaux, nous pourrions corréler les performances mnésiques aux paramètres électrophysiologiques et pratiquer des analyses de corrélation entre les différentes activités afin de mettre à jour le degré de communication entre les différentes structures enregistrées. Pour cela les rats de ce projet recevront l'implantation, à l'aide de la technique de chirurgie stéréotaxique, d'électrodes d'enregistrement des PCL dans quatre structures d'intérêt (habénula latérale, cortex préfrontal, hippocampe, amygdale). Les tests comportementaux que nous effectuerons sont des tests de référence lorsque l'on étudie les processus mnésiques : labyrinthe radial (mémoire de travail), reconnaissance spatiale dans un champ ouvert (mémoire de référence spatiale), conditionnement de peur (mémoire émotionnelle). 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. 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 avec un minimum de stress ; 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 les processus mnésiques, il n'est pas possible de recourir à d'autres modèles. Ainsi le projet nécessitera 90 animaux.

10460 Le striatum est une région sous-corticale faisant partie des ganglions de la base, qui a un rôle fondamental dans le contrôle de l'action. Plusieurs études ont montré qu'une dissociation fonctionnelle existe entre la partie dorso-latérale et dorso-médiane dans ce processus. En particulier, chez le rat le striatum dorso-médian (SDM) – équivalent au noyau caudé chez les primates – contrôle les actions explicitement dirigées vers un but, tandis que le striatum dorso-latéral

(SDL) – équivalent au putamen chez les primates – interviennent lorsque les actions sont devenues automatiques et inflexibles. Toutefois, il demeure incertain si et comment ces deux processus interagissent afin de produire la réponse correcte. L'objectif de ce projet est d'étudier cette question en testant les effets induits par les lésions du SDM et du SDL dans une tâche comportementale dans laquelle les rats apprennent à fournir une réponse en fonction du stimulus qui leur est présenté. En particulier, les animaux doivent fournir une réponse à droite (ou à gauche) lorsqu'un stimulus lumineux d'intensité forte (ou faible) est présenté, et une réponse du côté opposé lorsqu'un stimulus lumineux d'intensité faible (ou forte) est présenté. Les stimuli peuvent être présentés soit à droite soit à gauche, ce qui produit des réponses compatibles (par exemple stimulus à droite et réponse à droite) et incompatibles (par exemple stimulus à gauche et réponse à droite). Des études précédentes à la fois chez l'Homme et chez le rat ont montré que les réponses compatibles sont plus rapides et automatiques, tandis que les réponses incompatibles sont plus lentes et explicites puisque demandent une évaluation (consciente) de la situation et des ressources attentionnelles plus importantes. Cette tâche, dite de 'Simon', représente donc un bon modèle pour tester l'implication de systèmes impliqués dans le contrôle des actions automatiques et explicites.

Ce projet d'une durée de 2 ans, nécessitera l'utilisation de 48 rats male Long-Evans adultes. Nous mettrons en œuvre différentes stratégies expérimentales afin de respecter la règle des 3R :

Raffinement : La chirurgie sera effectuée sous anesthésie générale, les paramètres vitaux (respiration, fréquence cardiaque, température corporelle) contrôlés constamment et la douleur prise en charge par analgésie durant toute la manipulation.

Réduction : Les animaux seront inclus aux protocoles par groupes de 8 rats et l'utilisation ultérieure d'animaux soumise à la confirmation histologique de la lésion, ce qui permettra de corriger si besoin est les coordonnées stéréotaxiques de la structure concernée et d'envisager ou pas l'utilisation d'autres rats. Pour chaque groupe les résultats comportementaux seront vérifiés à l'aide de tests statistiques avant de définir combien d'animaux faut-il inclure dans les groupes successifs.

Remplacement : Les rats représentent le modèle privilégié dans ce type d'études et une vaste littérature existe sur ce sujet, ce qui permet de mieux interpréter les résultats. Ils ne peuvent pas être remplacés dans ce projet car ce dernier comporte de méthodes invasives de lésions intracérébrales qui ne sont par exemple pas compatibles avec des approches chez l'humain.

10461 La capacité de se repérer dans l'espace repose sur l'activité d'un réseau de neurones localisés dans les régions hippocampiques et parahippocampiques. Ces neurones, découverts chez le rat, comprennent les place cells de l'hippocampe, qui s'activent chaque fois le sujet se trouve dans un endroit précis de l'espace, et les grid cells du cortex entorhinal, qui comme les place cells s'activent en fonction de la position du sujet mais présentent plusieurs champs d'activité formant une grille étalée sur tout l'espace exploré par le rat. Il a été émise l'hypothèse que cette activité régulière est le reflet de la formation d'une carte métrique et universelle de l'espace, qui dépend exclusivement des informations générées par les déplacements du rat. Toutefois, des études récentes ont montré que l'environnement externe peut avoir une influence sur la structure de la carte générée par l'activité des grid cells. Il est donc possible que cette carte ne soit pas universelle mais pourrait s'adapter aux caractéristiques de chaque environnement. Nous proposons de tester cette

hypothèse en analysant les effets sur l'activité des grid cells induits par les modifications de l'environnement et également de la stratégie comportementale utilisée par l'animal pour se déplacer dans l'environnement. Pour cela nous proposons : 1) de comparer l'activité des grid cells dans des environnements bidimensionnels, comme une arène, et unidimensionnels, comme un couloir circulaire ; 2) d'analyser comment l'activité des grid cells se modifie lorsque l'animal doit trouver un emplacement non indicé dans une arène en utilisant soit les informations externes (stratégie de navigation allocentrée) soit les informations issues de ses déplacements (stratégie de navigation égocentrée).

Le nombre total d'animaux qui sera utilisé dans toutes les expériences ne dépassera le nombre de 24. Nous mettrons en œuvre différentes stratégies expérimentales afin de respecter la règle des 3R :

Réduction : Pour les enregistrements nous utiliserons des dispositifs multi électrodes comportant de 16 à 32 canaux ce qui permet de maximiser le nombre de cellules enregistrées et donc à terme d'augmenter la force statistique des résultats tout en participant à réduire le nombre d'animaux utilisés. Les animaux seront inclus aux protocoles par groupes de 4 et l'utilisation ultérieure d'animaux soumise à la confirmation histologique du bon positionnement des électrodes du groupe précédent ce qui permettra de corriger si besoin est les coordonnées stéréotaxiques de la structure concernée et d'envisager ou pas l'utilisation d'autres rats.

Raffinement : La chirurgie sera effectuée sous anesthésie générale, les paramètres vitaux (respiration, fréquence cardiaque, température corporelle) contrôlés constamment et la douleur prise en charge par analgésie durant toute la manipulation.

Remplacement : Les rats représentent le modèle privilégié dans ce type d'études car ils sont dotés de grandes capacités d'orientation dans l'espace. Ils ne peuvent être remplacés dans ce projet car ce dernier comporte de méthodes invasives d'enregistrements intracrâniens qui ne sont par exemple pas compatibles avec des approches chez l'humain.

L'ensemble de ces expériences nous permettront de mieux comprendre la nature des signaux spatiaux qui sont générés dans le cerveau de rats mais qui sont également présents dans d'autres espaces de mammifères, y compris l'Homme.

10462 La phase d'immunosuppression qui accompagne les sepsis graves (infection générale non contrôlée) est volontiers associée à un profond déficit du compartiment de l'immunité humorale, notamment marqué par un effondrement du nombre de lymphocytes B circulants et vraisemblablement aussi des lymphocytes B tissulaires. Les conséquences immunorégulatrices du déficit B peuvent être majeures puisque les cellules B ne sont pas seulement des effecteurs terminaux de la réponse immune, mais elles peuvent aussi largement agir en tant que cellules présentatrices des antigènes aux lymphocytes T ainsi qu'en tant que cellules globalement régulatrices du phénomène de polarisation des réponses immunes. D'ailleurs, le déficit immunitaire n'est pas restreint au compartiment B et s'inscrit dans une déplétion globale et un épuisement T et B qui met l'organisme en danger puisqu'il le rend incapable de lutter efficacement contre les agents infectieux.

Les causes de la déplétion du compartiment B sont à ce jour totalement inconnues (mort de type apoptose ou nécroptose ? hyperactivation résultant in fine en un phénomène de mort de type « d'activation–induced cell death » ?) et font l'objet de cette étude. Dans ce cadre, notre projet est d'étudier la mise en jeu du mécanisme « d'activation–induced cell death » au cours du sepsis et de mieux caractériser la contraction subie par le compartiment B. L'étude du sepsis chez l'homme est très difficile car les patients sont en état critique lors de leur admission à l'hôpital. Les résultats obtenus sont très hétérogènes car la maladie peut être présente en différentes stades de gravité et de durée lors de son diagnostic. Le modèle murin des sepsis, obtenue par une ligature et une ponction du tube digestif, permet d'avoir des informations plus homogènes et donc fiables sur le développement du sepsis, et les causes de la déplétion en cellules B.

Ce projet utilise au total 24 souris.

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

Remplacer : Il n'existe pas de moyens in vitro pour reproduire la maladie qui met en jeu des interactions complexes entre plusieurs organes du système immunitaire. La souris est l'espèce

modèle la plus adaptée car son système immunitaire est proche de celui de l'homme faisant de la souris un modèle expérimental incontournable pour l'étude des dysfonctionnements immunitaires. Réduire : Les expériences sont organisées dans un ordre précis, avec des témoins choisis de sorte à limiter la répétition d'expériences. Les manipulations sont réalisées de façon indifférente sur des mâles et des femelles, permettant ainsi une réduction du nombre d'animaux générés dans l'élevage. Le fond génétique des souris est contrôlé ce qui limite la variabilité des résultats et de fait limite le nombre d'animaux nécessaires pour des résultats fiables sur le point de vue statistique.

Raffiner : Les animaux sont élevés dans des conditions d'hébergement (température et hygrométrie de l'environnement, densité d'animaux, présence systématique d'enrichissement, change régulier de la litière, nourriture et eau à volonté, surveillance quotidienne de l'état général des animaux) qui respectent leur bien-être. De plus, l'ensemble des procédures est réalisé de manière à limiter le stress et la souffrance des animaux : la ligature et la ponction du caecum sont effectuées sous anesthésie générale. Après la chirurgie, les souris sont surveillées toutes les heures et la douleur est contrôlée par l'administration toutes les 12 heures d'un antalgique puissant de la famille de la morphine. Les souris qui atteignent le point limite (léthargie, difficultés respiratoires, diminution d'activité) sont immédiatement euthanasiées.

10463 Au cours de leur développement, les lymphocytes B expriment à leur surface le récepteur de cellule B (BCR), permettant ainsi la liaison spécifique d'antigène et une initiation de la réponse immunitaire. Lors d'une réponse primaire, l'activation T dépendante des LB par l'Ag dans les centres germinatifs des organes lymphoïdes secondaires provoque une prolifération cellulaire soutenue suivie de la maturation terminale des LB en plasmocytes sécréteurs d'Ig ou en LB mémoires. Cette maturation peut se caractériser par l'occurrence de deux événements majeurs : la commutation de classe ou commutation isotypique des Ig (class switch recombinaison, CSR) et l'hypermutation somatique (somatic hypermutation, SHM). La CSR est une recombinaison intra-chromosomique qui a lieu sur le locus IgH entre deux régions switch (S) situées en amont de chaque segment constant © codant la région constante des Ig. Elle permet la synthèse de différents isotopes d'Ig caractérisés chacun par des fonctions effectrices distinctes sans affecter la spécificité antigénique des Ig. Parmi les cinq classes d'immunoglobulines, l'IgA est l'isotype le plus abondant produit principalement au niveau des sites muqueux qui jouent un rôle primordial dans la protection contre les microorganismes pathogènes qui peuvent se trouver dans le tractus digestif. Chez l'Homme, les IgA sont divisées en deux sous-classes : IgA1 et IgA2 se distinguent par leur structure et leur distribution corporelle. La synthèse IgA2 parmi les anticorps sériques est généralement minime par rapport à celle des IgA1. L'objectif principal de ce projet est d'étudier l'impact de l'expression du récepteur de classe IgA2 sur la différenciation des lymphocytes B murines en remplaçant le gène humain $\alpha 2$ à la place de la région switch mu ($S\mu$) dans un modèle transgénique existant. Nous étudierons également des mécanismes de la recombinaison du locus IgH vers l'IgA2. Il est à noter que l'immunisation induite avec une production d'anticorps n'a pas de conséquences sur l'état de santé de l'animal.

Ce projet utilise au total 140 souris.

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

Remplacer : Nous examinerons l'effet de l'expression d'un BCR IgA2 sur le développement des lymphocytes B ainsi que les mécanismes impliqués dans la recombinaison du locus IgG vers l'IgA2. Les modèles in vitro ne permettent pas de modéliser la complexité de la réponse immunitaire d'un organisme entier. Il n'existe pas des lignées cellulaires ou d'autres modèles qui permettent d'évaluer la synthèse des immunoglobulines, le développement des lymphocytes B et le capacité d'IgA2 de déposer dans les reins. La souris est l'espèce modèle la plus adaptée du fait qu'il existe une très forte homologie de structure et fonction entre les loci IgH humain et murin faisant de la souris un modèle expérimental incontournable pour l'étude des dysfonctionnements immunitaires. Réduire : Les expériences sont organisées dans un ordre précis, avec des témoins choisis de sorte à limiter la répétition d'expériences. Les manipulations sont réalisées de façon indifférente sur des mâles et des femelles, permettant ainsi une réduction du nombre d'animaux générés dans l'élevage. A la fin de l'expérimentation, les souris sont euthanasiées et tous les organes d'intérêt pour toutes les manipulations sont prélevés pour la suite de l'étude pour réduire la répétition des manipulations.

Raffiner : Les animaux sont élevés dans des conditions d'hébergement (température et hygrométrie de l'environnement, densité d'animaux, présence systématique d'enrichissement, change régulier de la litière, nourriture et eau ad libitum, surveillance quotidienne de l'état général des animaux) qui respectent leur bien-être. De plus, l'ensemble des procédures sera réalisé de manière à limiter le stress et la souffrance des animaux (anesthésie pour le prélèvement de sang, pommade ophtalmique). Les souris sont euthanasiées par dioxyde de carbone utilisant un appareil automatisé Quietec conforme à la réglementation qui augmente progressivement la concentration de CO₂ avant tout prélèvement d'organe ou tissu.

10464 L'atrophie multisystématisée (AMS) est une maladie neurodégénérative orpheline et fatale qui ne possède à ce jour aucun traitement curatif. Elle se traduit par des problèmes locomoteurs très lourds et une espérance de vie extrêmement réduite une fois la maladie diagnostiquée. Il y a donc un réel besoin de développer des outils thérapeutiques de manière à enrayer le développement de cette maladie fulgurante. L'AMS se caractérise par la présence d'inclusions cytoplasmiques contenant la protéine alpha-synucléine (SYN) agrégée dans un type cellulaire du cerveau, les oligodendrocytes. Selon plusieurs données expérimentales, l'agrégation de la SYN serait à l'origine des déficits moteurs et du processus neurodégénératif de l'AMS.

Nous avons récemment montré que la voie de signalisation de l'insuline, hormone connue pour son effet sur la glycémie, notamment dans le diabète, mais qui possède également un rôle capital dans le cerveau dans le maintien de la survie des neurones était impliquée dans l'AMS.

En effet, que ce soit chez les patients ou chez le modèle transgénique de souris AMS (souris PLP-SYN, modèle surexprimant la protéine alpha-synucléine) une diminution de la voie de signalisation de l'insuline appelée « résistance à l'insuline » a été observée qui se traduit par une l'insensibilisation des récepteurs cellulaires membranaires à l'insuline. De ce fait, malgré la production de l'insuline par le pancréas, le glucose ne pénètre plus autant dans les cellules, qui deviennent de ce fait sous-alimentées.

Cette voie de signalisation de l'insuline constitutive donc une cible thérapeutique sur laquelle agir afin de restaurer potentiellement cette voie essentielle à la survie neuronale. La voie de signalisation de l'insuline est régulée négativement par une enzyme cellulaire appelée GRK2 (G protein couple receptor kinase 2) et il a été montré que celle-ci était retrouvée en quantité plus importantes chez des modèles animaux de résistance à l'insuline, ainsi que chez des personnes présentant des problèmes métaboliques.

Le but de ce projet est de déterminer si la suppression de l'expression de GRK2 dans le modèle de souris AMS (les souris PLP-SYN) entraîne une diminution de la résistance à l'insuline au niveau des structures cérébrales impliquées dans la maladie mais aussi dans les organes périphériques, et également une diminution des troubles moteurs et de la perte neuronale retrouvée dans ces modèles.

Le projet s'articule en deux étapes. La première déterminera s'il y a une surexpression de GRK2 chez les souris PLP-SYN et si en injectant une petite séquence d'ARN (miRNA) qui empêche l'expression de la protéine GRK2 diminue cette surexpression, les déficits locomoteurs, la neurodégénérescence et l'accumulation pathologique de l'-synucléine. Les animaux adultes PLP-SYN recevront des injections intracérébrales au niveau du striatum soit d'un virus exprimant la séquence du miR dirigée contre GRK2 (dont l'efficacité qui a été validée in-vitro) soit une séquence dite « brouillée » qui servira de contrôle. Si cette lignée n'a pas de phénotype nocif pouvant altérer sa qualité de vie, elle montre néanmoins un léger déficit moteur, détectable au court de tests comportementaux qui analysent une motricité fine. Un test de traversée d'une poutre visant à mesurer la coordination motrice des souris sera effectué avant et après chirurgie. Les animaux seront ensuite euthanasiés pour évaluer l'expression de GRK2 dans le cerveau et les organes périphériques (cœur, estomac, reins, foie, muscle).

Si cette première étape permettra d'obtenir une preuve de concept avec une injection locale dans une région du cerveau, l'efficacité que nous recherchons doit être observée dans tout le cerveau. Nous avons besoin d'apporter cette séquence inhibitrice dans tout le cerveau. Pour pouvoir obtenir ce résultat, nous allons utiliser l'approche in utero d'injection intracérébrale de cette séquence inhibitrice et son contrôle chez des embryons de E15. Après leur naissance, les animaux seront

maintenus en vie jusqu'à 6 mois, l'âge auquel les animaux montrent un léger déficit moteur. Un test de traversée d'une poutre visant à mesurer la coordination motrice des souris sera effectué et les animaux seront alors mis à mort pour évaluer l'expression de GRK2 dans le cerveau et les organes périphériques (cœur, estomac, reins, foie, muscle). L'analyse des effets sur le comportement moteur nous contraint à utiliser des animaux.

Dans le respect de la règle des 3R afin de réduire le nombre d'animaux, une analyse de puissance a été effectuée, permettant de réduire le nombre à 84 souris incluant les groupes expérimentaux et leurs contrôles. Pour le respect du R de raffiner, nous avons vérifié qu'aucune donnée actuelle n'indique que l'inactivation de GRK2 soit susceptible d'entraîner une souffrance chez les animaux. Toutes les souffrances liées aux chirurgies seront soulagées par les molécules les plus adaptées. Les tests comportementaux réalisés feront appel au comportement spontané de l'animal sans contention. 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'antalgiques les plus adaptés à chaque procédure, optimiser les procédures soulager le stress des animaux et leur fournir les meilleures conditions de vie tout au long du projet. Pour cela, les chirurgies stéréotaxiques et in utero 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. 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. 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.

10465 Aloe Djiboutiensis est une plante uniquement présente à Djibouti et très utilisée dans les soins traditionnels généralement comme laxatif. Cette utilisation massive met en danger la survie de cette espèce. En effet les utilisateurs déracinent souvent une plante entière pour n'utiliser que les feuilles le dosage n'est pas du tout fiable. Pour développer une utilisation raisonnée, ce projet vise à permettre le test pour la mise sur le marché d'un médicaments traditionnels améliorés (MTA) utilisant cette plante.

Notre partenaire a réalisé des tests in vitro prometteurs et cet essai in vivo constitue la dernière étape pour finaliser cette formulation.

La mise à disposition de formulations à très bas prix est une chance pour deux raisons. D'abord cela permettrait considérablement la collecte massive et destructrice par les locaux. Enfin la population locale qui n'a pas accès généralement aux soins conventionnels pourra l'utiliser sans avoir les effets indésirables liés aux préparations d'extraits actuels, dont les constituants sont variables et présentent des effets indésirables (notamment des infections du tube digestif).

Ce projet testera donc sur des souris, la bonne tolérance de la formulation d'Aloe en gavage, et étudiera aussi les effets sur les paramètres sanguins et une possible inflammation du tube digestif au niveau histologiques.

10 animaux par sexe et par traitement (contrôle ou traité) seront utilisés, soit un total de 40 animaux. Un gavage sera pratiqué, suivi d'un prélèvement sanguin puis d'une euthanasie pour l'étude histologique.

Remplacement : toutes les études préalables ont été faites in vitro et les analyses biochimiques ont permis de formuler une préparation qui est compatible avec l'utilisation chez des mammifères. Le modèle murin nous permettra de travailler sur un organisme complet et d'avoir accès à de nombreuses techniques d'analyses, permettant de valider l'innocuité et les effets de la formulation. Réduction : 10 animaux par groupe expérimental constituent un effectif minimal mais suffisant pour conclure sur les paramètres de la biochimie sanguine étudiés ainsi que l'histologie.

Raffinement : les animaux seront observés quotidiennement, avec eau et nourriture à disposition. Suite au gavage, une surveillance spécifique sera mise en place, pour s'assurer de l'absence d'altération de l'état de l'animal.

L'euthanasie pourrait s'avérer nécessaire si nous observons :

- une fausse route liée au gavage

- un mauvais état général de l'animal (mauvais toilettage, lésion non cicatrisée, prostration.) persistant après des soins vétérinaires

10466 L'excès de masse grasseuse est une caractéristique de l'obésité et aussi un facteur de risque pour le développement de maladies chroniques. Le traitement permanent de l'obésité est délicat car il est difficile de maintenir la perte de poids. Des traitements pour stabiliser la perte de poids sont nécessaires. Les cellules adipeuses (adipocytes) sont des régulateurs clés du poids corporel et sont une cible potentielle pour les traitements permettant cette stabilisation pondérale. Après la perte de poids, il y a des changements dans la capacité des adipocytes à stocker et à libérer de l'énergie, qui favorisent la reprise de poids. Les polyphénols sont des composés que l'on retrouve notamment dans les fruits et les légumes. Au cours de ces dernières années, ces polyphénols ont reçu beaucoup d'attention de la communauté scientifique et du public pour leur action sur les adipocytes. Des études cellulaires ont en effet montrés des effets sur la capacité des adipocytes à stocker et à libérer de l'énergie.

Dans le cadre d'un projet d'étude visant à comprendre l'effet des polyphénols sur le métabolisme et la fonction des adipocytes, nous avons dans un premier projet défini le meilleur temps d'analyse, lié à la propagation puis l'accumulation des polyphénols dans le tissu gras.

Nous souhaitons désormais comprendre l'implication d'un gène d'intérêt dans cette propagation et ce stockage. Pour cela, nous utiliserons une lignée de souris génétiquement modifiée, pour étudier l'impact de cette mutation sur ce stockage dans le tissu gras.

Deux composés sont actuellement en cours d'étude, et nous souhaitons les tester avec 11 animaux par groupe expérimentaux et les groupes contrôles respectifs. Cela représente un total de 88 animaux pour ce projet.

Remplacement : Notre projet de recherche nécessite l'utilisation d'un modèle animal, car à ce jour il n'est pas possible de réaliser ce type d'étude dans une simulation informatique ou par une expérience cellulaire. Un organisme vivant est nécessaire pour étudier le métabolisme des polyphénols qui est coordonné par plusieurs organes. La souris est un modèle de choix car son élevage est simple et son métabolisme est proche de l'humain.

Réduction : 88 souris seront utilisées dans cette expérience. Ce nombre de souris sera nécessaire pour obtenir une réponse statistiquement significative tout en minimisant l'utilisation des souris.

Raffinement : L'intervention principale de cette expérience sera le gavage de polyphénols. Le gavage n'induit pas de douleur mais il est brièvement inconfortable. Pour minimiser de potentiels risques les expérimentateurs vont surveiller les souris après l'administration. Si les expérimentateurs remarquent une détresse chez la souris, l'animal sera euthanasié de manière éthique.

10467 La compréhension du mécanisme d'action des médicaments à visée neurologique permet d'optimiser leur utilisation chez les patients et d'améliorer leur réponse pharmacologique tout en prévenant l'apparition d'effets indésirables. Cela s'applique à de nombreuses classes de médicaments et concerne aussi bien les pathologies psychiatriques (dépression, schizophrénie, addiction, etc...) que les pathologies neurologiques (épilepsie, maladies d'Alzheimer, narcolepsie, maladie de Parkinson, etc...).

Les approches de pharmacologie in vitro permettent d'obtenir des informations sur ces mécanismes, en mettant par exemple en évidence les interactions d'un médicament avec les différents composants d'une cellule. Elles ne sont malheureusement pas suffisamment prédictives de l'efficacité et/ou de la toxicité du médicament qui dépend de son devenir dans l'organisme, de sa disponibilité au niveau des tissus cibles et notamment au niveau du cerveau dont la structure et la composition sont extrêmement complexes.

Le recours à un modèle in vivo, et donc un modèle animal, est alors indispensable. Toutefois, la mise en évidence de l'interaction des médicaments avec les différentes cibles pharmacologiques est particulièrement complexe, notamment au niveau cérébral. Elle nécessite, entre autres, l'utilisation de méthodologies d'imagerie non invasives, qui, évaluées et validées chez l'animal, sont transposables à l'Homme. Dans ce cadre, l'imagerie est particulièrement pertinente car elle permet,

de manière non-invasive, de mesurer l'interaction du médicament avec sa cible biologique, voire de suivre sa distribution dans les différentes régions cérébrales.

Les techniques d'imagerie utilisées sont sensiblement identiques à celles utilisés chez l'Homme et ne sont pas invasives. Cela permet aux animaux de participer à plusieurs protocoles d'imagerie pour permettre i) un suivi longitudinal ou ii) l'utilisation de différentes modalités d'imagerie permettant d'acquérir des données complémentaires issues d'un seul et même animal. Dans ce cas, l'animal est remis en cage après son réveil, en attendant le prochain examen d'imagerie. Cette spécificité de l'imagerie va dans le sens de la réduction du nombre d'animaux nécessaires aux études (3R).

L'objectif de l'étude est de mettre au point pour plusieurs médicaments des protocoles d'imagerie capable de révéler leur interaction avec leur cible biologique. Les doses chez l'animal sont parfaitement maîtrisées dans la littérature, en termes d'efficacité et d'effets secondaires. Ainsi, aux doses prévues dans cette étude, aucune toxicité ni aucune souffrance ne sont attendues. Pour réaliser les examens d'imagerie peut nécessiter l'administration d'un radiotracer spécifique d'une cible pharmacologique donnée. Ces examens sont réalisés chez des animaux « contrôle » ayant reçu un placebo, et chez des animaux ayant reçu le médicament testé à différentes doses. Les études sont réalisées chez des animaux sains ou sur des modèles animaux mimant une pathologie cérébrale.

Le nombre de rongeurs, nés et élevés dans des établissements agréés, sont au nombre de 36 animaux par étude (soit 360 sur 5 ans) ce qui est généralement suffisant pour établir une différence statistique existante sur l'effet du médicament et/ou de la dose administrée. Les animaux seront habitués à la manipulation avant le début du protocole ce qui permet de diminuer l'état de stress et d'améliorer leur bien-être. Ils seront hébergés en groupe dans une cage enrichie avec des accessoires de jeu et du matériel pour la fabrication de nids. Aucune douleur ni souffrance ne sont attendues dans ce protocole, toutefois des critères d'arrêt d'expérimentation ont été réfléchis et seront appliqués afin d'empêcher toute souffrance animale.

10468 Pour devenir cancéreuse, une cellule doit subir plusieurs évènements oncogéniques (altération des gènes), modifiant des fonctions en lien avec la prolifération, la mort ou l'interaction avec l'environnement. Différents types de translocations (changement de place d'un gène) sont retrouvés lors des lymphomes B (un cancer du lymphocyte B). Les plus fréquentes provoquent la juxtaposition d'un élément régulateur à la séquence codante d'un oncogène (un oncogène est un gène sur-exprimé dans une cellule cancéreuse par rapport à sa contrepartie normale). C'est par exemple la translocation c-myc au locus IgH (segment d'ADN codant la synthèse des chaînes lourdes des immunoglobulines produites par le lymphocyte B) lors du lymphome de Burkitt. Ces translocations sont généralement un des évènements les plus précoces de la transformation cancéreuse, mais ne sont pas suffisants pour aboutir à un cancer. La cellule devra subir plusieurs évènements géniques, contournant les différents « checkpoints » de la cellule, en affectant le cycle cellulaire, la résistance à la mort et la signalisation intracellulaire, avant une cancérisation complète. La majorité des lymphomes humains sont issus de cellules du centre germinatif (CG : c'est un lieu où se déroulent d'intenses proliférations dans la rate ou les ganglions) ou post-CG. Ceci s'explique par leur prolifération intense et le déroulement des hypermutations somatiques (SHM : mutations naturelles qui surviennent dans le lymphocyte B) et de la recombinaison isotypique (CSR : changement de la partie constante de l'immunoglobuline produite par le lymphocyte B) qui augmentent le risque de mutations oncogéniques.

C'est le locus IgH qui est le chef d'orchestre de la maturation lymphocytaire B. Les éléments tardifs de celle-ci (synthèse de la chaîne mu, CSR et SHM) sont sous la dépendance des activateurs transcriptionnels (séquences d'ADN stimulant l'expression d'un gène) de la région cis-régulatrice 3' (« super-enhancer » 3'RR) du locus IgH. La plupart des lymphomes B matures sont caractérisés par une translocation déplaçant un oncogène au locus IgH où il sera transcrit, de façon constitutive, sous le contrôle des éléments cis-régulateurs du locus. La fréquence élevée de ces altérations géniques s'explique par l'induction de cassures chromosomiques dépendantes de l'enzyme AID (une enzyme qui attaque l'intégrité physique de l'ADN) lors des SHM et de la CSR.

L'implication de la 3'RR dans le développement des lymphomes B matures a été validée, par diverses équipes dont la nôtre, grâce à des modèles de souris transgéniques (souris génétiquement modifiées pour mimer le développement de maladies humaines). La très grande similarité structurale entre la 3'RR de l'homme et de la souris fait, de cette dernière, un modèle expérimental de choix. Notre laboratoire vient de faire des avancées majeures sur le mécanisme d'action de la 3'RR. Le primum movens de la 3'RR sur la transcription est une modification de l'épigénome (structure tridimensionnelle) de son ADN cible. Notre objectif est de comprendre, à partir de différents modèles murins de lymphomagenèse B, comment s'active le « super-enhancer » 3'RR, quels signaux moléculaires sont précisément impliqués (rôle potentiel des HDAC qui participent à l'ouverture de l'ADN ?) et comment il peut agir sur l'expression de l'oncogène inséré au locus IgH (modification spécifique et ciblée de l'épigénome ?). Il est envisageable que le ciblage pharmacologique de la 3'RR par des drogues inhibitrices (comme des HDAC inhibiteurs) puisse se révéler une approche thérapeutique intéressante lors de certains lymphomes B matures. Les progrès à venir dans leur traitement vont provenir, en grande partie, d'une meilleure connaissance de leurs mécanismes de développement. Ceux-ci pourront notamment bénéficier de la compréhension des mécanismes qui participent à la régulation du locus IgH puisque c'est lui qui intervient directement dans la forte expression des oncogènes transloqués.

Ce projet utilise au total 570 souris. Ce projet expérimental répond aux exigences des 3R. Remplacer : Le thème de recherche a une pertinence avérée dans le cancer. Les modèles in vitro ne permettent hélas pas de modéliser la complexité de la cancérisation d'une cellule particulière au sein d'un organisme entier (ici un lymphocyte B parmi les centaines de milliards de lymphocytes B produits par l'organisme durant sa vie). La modélisation chez la souris est donc incontournable. Réduire : Le thème de recherche est maîtrisé par l'équipe et le porteur du projet, ce qui permet de limiter les étapes de mises au point et les expériences redondantes. Ces dernières sont réfléchies et organisées dans un ordre et nombre précis pour limiter leur répétition inutile. Le nombre d'expériences nécessaire est défini par des critères statistiques dans le but d'utiliser le moins de souris possible. Raffiner : les animaux sont élevés dans des conditions d'hébergement (température et hygrométrie de l'environnement, densité d'animaux, présence systématique d'enrichissement, change régulier de la litière, nourriture et eau ad libitum, surveillance quotidienne de l'état général des animaux) qui respectent leur bien-être. L'administration de thérapeutique n'est prévue que pour une minorité de souris dans le cadre unique de tests visant à prouver la validité des thérapeutiques (HDACi) sur le développement de la masse tumorale. L'ensemble des procédures sera réalisé de manière à limiter le stress et la souffrance des animaux (anesthésie, tapis chauffant pendant la chirurgie, analgésique post opératoire).

10469 Le surpoids et l'obésité se définissent comme une accumulation anormale ou excessive de graisse corporelle qui peut nuire à la santé (définition de l'organisation mondiale de la santé). En 2014, plus de 1,9 milliard d'adultes étaient en surpoids. Sur ce total, plus de 600 millions étaient obèses. L'obésité est un facteur de risque pour de nombreuses pathologies, dont les maladies cardiovasculaires, le diabète et certains cancers. Face à ce problème majeur de santé publique, plusieurs approches sont utilisées, dont l'utilisation de compléments alimentaires permettant de limiter la prise de poids et/ou les désordres métaboliques associés à l'obésité (par exemple l'insulino-résistance).

Dans ce projet nous chercherons à étudier les effets de différents extraits végétaux sur l'obésité et l'insulino-résistance, dans le but de déterminer et comparer leur potentiel préventif.

Nous étudierons l'effet biologique des extraits en utilisant un modèle génétique d'obésité (souris ob/ob) dans le cadre d'un régime à teneur lipidique normale (AIN-93M) supplémenté ou non avec l'extrait.

Le nombre total d'animaux nécessaires sera de 50.

Le développement de l'obésité et de ses conséquences métaboliques sera caractérisé de la façon suivante :

- pesée hebdomadaire et mesure de la consommation alimentaire ;
- prélèvements sanguins afin de mesurer l'évolution de la glycémie et de l'insuline plasmatique ;

- collection de fèces en début puis au cours du protocole pour caractériser le microbiote et mettre en évidence d'éventuelles modifications en fonction du régime ;
- mesure de la réponse glycémique en réponse à l'insuline pour mettre en évidence un dysfonctionnement de la réponse à l'insuline.

A l'issue des études, les animaux seront euthanasiés sous anesthésie générale pour prélèvement d'organes dans l'optique de caractériser les effets biologiques dans différents tissus.

Cette étude prendra en compte la règle des 3 Rs :

Remplacement : il n'existe à l'heure actuelle aucune méthode de substitution in vitro pour étudier l'impact d'extrait végétal sur l'insulino-résistance et la prévention de l'obésité. La souris est un modèle de choix car elle présente des mécanismes physiologiques proches de ceux qui sont observés chez l'homme.

Réduction : le nombre d'animaux est le minimum nécessaire pour mettre en évidence des différences statistiquement significatives entre les groupes.

Raffinement : Ce projet fait appel à des procédures peu invasives mais il nécessite de placer les animaux en cages métaboliques individuelles, ce qui représente un stress pour les animaux. Dans un souci de raffinement, il a été prévu d'utiliser un enrichissement de l'environnement sous forme d'igloo avec un plancher et de la définition de points limites qui sont contrôlés.

10470 Les comportements défensifs sont un sous-type de réponse comportementale au stress. Ils sont déclenchés par un stress aigu. Ils comprennent typiquement les réponses d'immobilisation, de fuite et de lutte. Chez certains patients, ces réponses peuvent devenir dysfonctionnelles et produire des troubles tels que le syndrome de stress post-traumatique, les attaques de panique, les troubles de l'anxiété ou les troubles dépressifs.

Notre équipe a identifié dans le tronc cérébral un noyau-clé dans l'établissement de la réponse au stress : le noyau latérodorsal du tegmentum (LDTg). L'activité du LDTg régule notamment le comportement défensif d'immobilisation chez une souris confrontée à des chocs électriques répétés. Le but de ce projet est donc de définir plus en détail le rôle du LDTg dans les comportements défensifs.

Pour ce faire, nous souhaitons utiliser un modèle murin car les circuits cérébraux impliqués dans les comportements défensifs de la souris sont similaires à ceux du modèle humain. Les comportements défensifs de la souris ont été largement décrits dans la littérature et nous disposons de nombreux tests pour en mesurer tous les aspects pouvant nous intéresser. Afin de mettre en évidence le rôle du LDTg dans ces comportements, nous souhaitons inhiber son activité grâce à deux méthodes différentes nécessitant chacune l'injection stéréotaxique d'un vecteur viral : le système pharmacogénétique DREADD (Designer Receptor Exclusively Activated by Designer Drug) et le système optogénétique eArch3.0. Chaque méthode d'inhibition a ses spécificités et avantages décrits dans le résumé technique, et leur innocuité a été maintes fois démontrée dans la littérature.

Afin d'étudier le rôle du LDTg dans les comportements défensifs, nous souhaitons donc inhiber le LDTg de nos souris durant trois différents tests comportementaux mettant chacun en évidence un ou plusieurs aspects des comportements défensifs murins (exploration, évaluation du risque, immobilisation, fuite ou agressivité). Chaque test comportemental correspond à une procédure puisque la sévérité de chacun de ces tests nous empêche de réutiliser une même souris dans différentes procédures.

PROCÉDURE 1 : Test de peur conditionnée associée au contexte.

PROCÉDURE 2 : Test d'exposition à l'odeur de prédateur.

PROCÉDURE 3 : Paradigme résident/intrus.

PROCÉDURE 4 : Test d'évitement actif et passif.

Dans chacune de ces quatre procédures, dix animaux par test seront réutilisés dans la procédure 5 (perfusion intracardiaque de PFA) pour réaliser des analyses histologiques.

Afin de disséquer les différentes projections du LDTg potentiellement impliquées dans les comportements défensifs de la souris, nous envisageons d'utiliser jusqu'à quatre modèles d'inhibition des souris. Chaque modèle est utilisé séquentiellement pour diminuer le nombre d'animaux nécessaire. Le modèle 1 (expérience-pilote) détermine dans quelle procédure les souris

des modèles 2, 3 et 4 seront engagées. Les modèles 2 et 3 déterminent le neurotransmetteur et la structure d'intérêt pour le modèle 4.

Ces modèles sont obtenus par l'injection stéréotaxique de différents produits viraux et sont détaillés dans le résumé technique.

Chaque procédure commencera par une ou plusieurs injections stéréotaxiques de produit viral selon le mode d'inhibition souhaité. Cette intervention chirurgicale sera suivie d'une période de convalescence de 3 semaines servant à l'expression virale, puis d'un des tests comportementaux décrits précédemment selon la procédure engagée. La réalisation de l'ensemble des conditions expérimentales devrait nécessiter jusqu'à 1700 souris, mais le nombre exact de souris nécessaire peut diminuer selon la procédure d'intérêt retenu selon les résultats du premier modèle d'inhibition (expérience-pilote).

Cette étude permettra de remanier la carte des circuits cérébraux impliqués dans les comportements défensifs en y ajoutant la position et le rôle du LDTg pour mieux comprendre les effets des traitements actuels et ouvrir de nouvelles fenêtres thérapeutiques pour traiter les troubles liés au stress.

Les procédures présentées dans ce projet ont été pensées afin de prendre en compte les objectifs de la règle des 3R :

Remplacement : La souris est le modèle animal ayant le moindre potentiel de douleur chez lequel la complexité des structures et circuits cérébraux impliqués dans les comportements défensifs chez l'Homme est conservée.

Réduction : Le nombre d'animaux indiqué correspond au minimum nécessaire calculé par analyse prédictive pour obtenir des résultats statistiquement pertinents. La nature stressante des tests utilisés empêche toute réutilisation d'une même souris dans plusieurs procédures.

Raffinement : Les résultats comportementaux dépendent directement du niveau de stress des animaux. Nous portons donc une attention particulière aux conditions d'hébergement et de soin des animaux, ainsi qu'à la diminution du stress et de la douleur à leur minimum pour chaque procédure (suivi quotidien via fiche en annexe avec définition de points-limites adaptés.)

10471 La glomérulonéphrite extramembraneuse (GEM) est une maladie autoimmune rénale rare mais grave avec une incidence d'environ 1,3 cas/100 000 habitants par an en France et en Europe. Il s'agit cependant d'une cause majeure de syndrome nephrotique, conduisant à la perte du rein pour environ 40% des patients. Le diagnostic et la prise en charge de la GEM sont complexes, et les thérapies actuelles sont basées sur l'utilisation d'immunosuppresseurs non spécifiques induisant des effets secondaires graves.

Les mécanismes physiopathologiques à l'origine de la maladie (réaction autoimmune et production des anticorps) et de la perte du rein (action directe des anticorps circulants sur les podocytes du rein) commencent à être compris depuis moins de 10 ans. En 2009, le principal élément du rein contre lequel le système immunitaire se retourne (c'est-à-dire le principal autoantigène) impliqué dans la GEM adulte a été identifié : il s'agit de PLA2R1, un récepteur présent dans les podocytes du rein, des cellules d'une importance cruciale pour la fonction de filtration rénale. Environ 70% des patients ont des anticorps circulants dirigés contre PLA2R1. Ces anticorps permettent un meilleur diagnostic des formes de GEM liées à PLA2R1 et une meilleure prise en charge des patients, puisque le dosage des anticorps (il existe déjà des tests commerciaux) permet d'affiner le diagnostic et le pronostic des malades et d'orienter le choix d'une thérapie parmi les différentes options disponibles. Un deuxième autoantigène, THSD7A, a été identifié en 2014 pour un autre groupe de patients d'environ 2%. Il reste donc à découvrir les autres autoantigènes pour les patients qui ne présentent d'anticorps ni pour PLA2R1 ni pour THSD7A (soit environ 28% des patients). Enfin, les patients atteints de GEM liée à PLA2R1 présentent plusieurs types d'anticorps anti-PLA2R1 dans le sang, dont la nature et la quantité sont associées à la sévérité de la maladie. Les fonctions normales de PLA2R1 et THSD7A dans le rein sont encore inconnues.

La formation de complexes immuns constitués par les autoanticorps et leurs autoantigènes au niveau de la membrane basale glomérulaire, proche de la surface des podocytes, est une caractéristique fondamentale de la maladie. Cependant, le rôle pathogénique des anticorps anti-

PLA2R1 dans le développement de la GEM n'est pas formellement démontré. C'est ce que nous proposons de faire dans ce projet.

Il n'existe à ce jour aucun modèle animal permettant de récapituler la physiopathologie de la GEM due à PLA2R1 et de montrer la pathogénicité des autoanticorps. La raison principale est l'absence d'expression naturelle de PLA2R1 dans les podocytes chez la souris, le rat ou le lapin, les espèces les plus utilisées dans la recherche préclinique biomédicale. Plusieurs laboratoires ont essayé de sur-exprimer PLA2R1 dans les podocytes de souris, mais à ce jour sans succès. L'utilisation d'un primate non-humain dans le cadre de ce projet est donc justifiée par l'impossibilité d'établir un modèle de la maladie chez le rongeur.

Ce projet vise à établir le premier modèle de GEM liée à PLA2R1 chez un primate non humain, le singe écureuil (*Saimiri sciureus*). L'expression de PLA2R1 a été validée dans les podocytes de ce primate, à des niveaux comparables à ceux mesurés chez l'homme.

Le projet a deux objectifs principaux indépendants :

1. Induire la maladie rénale en injectant chez l'animal des anticorps anti-PLA2R1 purifiés à partir de sérum de patients atteints de GEM. Ce modèle d'immunisation « passive » de la GEM est relativement simple car il ne dépend pas de la mise en place d'une réponse autoimmune chez l'animal mais seulement de la capacité des anticorps de patients à se lier sur PLA2R1 dans le rein et former des complexes immuns, ce que l'on attend puisque PLA2R1 est présent dans les podocytes de l'animal et reconnu par les anticorps de patients.

2. Induire la maladie rénale en injectant cette fois l'antigène PLA2R1 sous différentes formes pour reproduire chez l'animal une réaction autoimmune conduisant à la production d'autoanticorps anti-PLA2R1 et à leur toxicité sur le rein. Ce modèle d'immunisation active de la GEM est plus proche de ce qui se passe chez les patients, depuis la mise en place de la réaction autoimmune à l'action des anticorps au niveau du rein.

Ce projet utilisera un total de 12 primates mâles adultes. Objectif 1 : 4 individus, chacun injecté avec des anticorps différents provenant de 3 patients et d'un donneur sain. Objectif 2 : 8 individus répartis en 4 groupes de 2. Chaque groupe sera injecté avec des antigènes PLA2R1 différents pour tenter d'induire une réponse autoimmune. Tous les primates seront hébergés au sein d'une plateforme de primatologie, permettant de garantir des procédures expérimentales et un protocole de soins optimal si la maladie est induite par l'un des protocoles ci-dessus (analgésie, antalgie, thérapie, bien-être animal, etc).

S'il aboutit, ce projet permettra de montrer pour la première fois la pathogénicité des anticorps anti-PLA2R1 dans un modèle animal très proche de la pathologie humaine, ce qui permettra de 1) mieux comprendre les mécanismes de la maladie et 2) ouvrir la voie à une thérapie spécifique.

10472 Le retrovirus oncogène simien T-lymphotrope de type 1 STLV-1 est à l'origine d'une lymphoprolifération des cellules T de façon similaire à son homologue humain HTLV-1.

Chez les hommes comme chez les singes il existe un autre sous type des rétrovirus oncogènes le HTLV-3 (ou STLV-3 chez le singe) dont la fréquence de détection est très faible.

Pour limiter les risques de fausse interprétation des résultats, l'étude de ce virus STLV-3 doit absolument se faire par comparaison. Ainsi nous connaissons les cellules cible de STLV-1 ainsi que les organes permettant sa prolifération mais en revanche rien n'est connu pour STLV-3. Nous nous proposons de rechercher par des techniques d'immunomarquage les sites de prolifération de virus STLV-3 sur des biopsies disponibles et cette demande concerne donc les animaux contrôles nécessaires aux conclusions de nos études. Ces études nous permettront de limiter les recherches invasives chez l'homme ou de cibler plus directement les analyses.

Dans un second temps, nous souhaitons comparer immunologiquement les animaux infectés par STLV-3 à des animaux sains (ceux de cette étude) afin d'appréhender pourquoi la fréquence de HTLV-3 est plus faible que celle de HTLV-1 en terme de nombre personnes infectées par ces deux types de virus. En effet les virus simiens et humains sont génétiquement identiques ou très proches pour le type 1 et le type 3 respectivement. Ces raisons ainsi que le fait que les individus soient naturellement infectés justifient l'utilisation de primates non humains pour nos études.

Les deux individus babouins de Guinée impliqués dans cette étude sont hébergés dans des groupes sociaux et seront isolés préalablement à l'étude. Leur environnement sera enrichi selon les

procédures en vigueur sur le site. Il s'agit d'une procédure 'sans réveil' qui se déroulera sur une journée. La procédure est sans réveil avec uniquement un prélèvement sanguin du vivant de l'individu sous anesthésie générale. Le nombre d'individus a été réduit au maximum afin de constituer un groupe contrôle suffisant pour comparer l'ensemble des données issues des différents échantillons tissulaires obtenus. Le nombre de deux individus contrôles est en lien avec une étude précédente de deux individus naturellement infectés pour lesquels une procédure expérimentale similaire a été réalisée.

10473 Clostridium difficile (CD), bactérie Gram positif anaérobie et sporulée, appartient au microbiote intestinal humain et représente la première cause de diarrhées infectieuses nosocomiales de l'adulte au décours d'un traitement antibiotique. Le taux de récurrences des infections à CD est probablement dû à la capacité de C. difficile de former des spores et des biofilms.

Il a été montré que C. difficile est capable de générer in vitro des biofilms uniquement en présence de désoxycholate de sodium (DOC), un acide biliaire secondaire, sous-produit du métabolisme des bactéries du microbiote intestinal. Le but du présent projet est d'étudier l'aptitude de C. difficile à générer in vivo des biofilms au niveau intestinal chez la souris axénique, c'est à dire dépourvue de germes, alimentée ou non avec du DOC afin de valider les résultats obtenus in vitro. Des souris C3H axéniques adultes recevront par gavage intra-gastrique une dose de bactéries de la souche sauvage ou d'une souche mutante incapable de former des biofilms en présence ou en absence de DOC. Ce projet comportera une procédure expérimentale, de niveau de sévérité « léger » car les souris ne sont pas sensibles aux infections à CD. Il apparaît parfois une légère diarrhée après 2 jours d'infection mais les souris se rétablissent vite. Afin d'éviter toute déshydratation, une coupelle contenant la nourriture mélangée à l'eau de boisson sera placée dans la cage. Dans le cas bien improbable où une déshydratation serait observée, une réhydratation avec du sérum physiologique par voie sous-cutanée pourra être pratiquée. Dans l'éventualité où des animaux seraient durablement malades, ils seront euthanasiés pour éviter toute souffrance. Par ailleurs, il est à noter que le gavage est un acte réflexe qui est sans douleur pour la souris et sera pratiqué par des personnes expérimentées.

La procédure nécessitera au maximum 96 souris. Des expériences précédentes indiquent qu'une expérience dupliquée avec 8 animaux par lot (soit 16 animaux par groupe expérimental) est le nombre requis pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. Un nombre inférieur d'animaux pourrait conduire à une expérience non interprétable en cas de décès accidentel d'un individu au cours de l'expérience.

Les animaux ne sont jamais privés de nourriture ni de boisson. Pendant la durée de l'expérience, ils restent dans leur environnement habituel. Les animaux ne sont pas isolés afin de maintenir une certaine sociabilité.

10474 Le microbiote digestif joue un rôle majeur dans la nutrition et la santé animale. En particulier, chez le ruminant, le microbiote présent au sein du rumen a une fonction clé dans l'hydrolyse et la fermentation des composants alimentaires, notamment les polysaccharides présents dans les parois végétales des fourrages. Le microbiote digestif est par ailleurs très important dans le développement des organes fonctionnels, et dans la maturation du système immunitaire. Des travaux réalisés dans les années 80 ont montré que le microbiote ruminal s'implantait dès la naissance chez l'agneau, grâce aux contacts répétés entre le nouveau-né et sa mère, favorisant l'inoculation du jeune. Le microbiote maternel joue donc un rôle essentiel dans l'établissement des communautés digestives chez le jeune. De précédents travaux réalisés dans le cadre d'un projet Région ont montré que la séparation précoce du nouveau-né et de sa mère, et la conduite des jeunes agneaux en atelier d'allaitement artificiel ont un effet plutôt négatif sur les performances des agneaux et leur santé. Ce type d'élevage est pratique commune chez le veau. Au niveau du microbiote, il a été montré que l'implantation des protozoaires ciliés dans le rumen était très fortement réduite chez des chevreaux élevés artificiellement par rapport à des chevreaux allaités par leurs mères, avec des conséquences négatives sur le développement du rumen et la croissance. Ces résultats ont été retrouvés lors de précédents travaux. Une diversité microbienne réduite chez le jeune pourrait conduire à une dysbiose et rendre l'animal plus sensible à des

pathologies digestives. Dans ce contexte, l'utilisation de levures vivantes, qui ont démontré leur efficacité dans la stabilisation des équilibres microbiens du rumen, pourrait être un levier intéressant pour favoriser la mise en place d'un microbiote complexe et fonctionnel dès les premiers jours de la vie. Des travaux antérieurs ont montré que ces levures, distribuées quotidiennement dès la naissance par sonde œsophagienne à des agneaux allaités par leurs mères, permettaient d'accélérer l'établissement des protozoaires et d'augmenter la concentration en bactéries cellulolytiques. Cependant, en élevage cette inoculation n'est pas envisageable pour des raisons pratiques, économiques, et liées au bien-être animal. Un apport de levures via la poudre de lait à des agneaux séparés de leur mère et allaités au lacto-remplaceur a démontré des effets intéressants sur l'implantation des protozoaires, des champignons et de certaines bactéries fibrolytiques. Cependant, les effets des levures ont été certainement limités au niveau ruminal, le lait n'accédant pas au rumen du fait de la fermeture de la gouttière œsophagienne.

De récents travaux réalisés chez l'homme suggèrent que le microbiote digestif pourrait commencer à s'installer avant la naissance, pendant la vie fœtale, et cette hypothèse est reprise par de nombreux articles comme étant transposable au ruminant du fait de la preuve de la présence de bactéries actives dès 20 minutes de vie au niveau du rumen et dans le méconium. Des études montrent que la supplémentation en probiotiques à la mère pendant la grossesse indiquent qu'une modification du microbiote maternel peut influencer la composition du microbiote du nouveau-né avant la naissance mais à notre connaissance aucune étude à ce jour n'a été publiée chez le ruminant.

Dans ce contexte, la supplémentation de levures à la mère pendant la gestation permettrait-elle d'orienter favorablement la cinétique d'implantation des communautés microbiennes digestives chez le nouveau-né ? Quels en seraient alors les effets sur les fonctions digestives, la santé et les performances des animaux ?

Pour répondre à ces questions, nous proposons de mettre en place une expérimentation impliquant 30 brebis gestantes de doubles lors du dernier mois de gestation et leurs agneaux suivis pendant 10 semaines d'âge (soit 90 animaux au total). Celles-ci seront conduites en deux lots (1 témoin T et 1 lot supplémenté avec des levures L) jusqu'à la mise bas. Les levures seront distribuées via l'alimentation quotidiennement sur cette période. Quelques heures après la naissance, chaque paire d'agneau sera divisée en deux lots, l'un restant materné M et l'autre placé en allaitement artificiel A. Dès lors, nous aurons quatre lot de 15 agneaux identifiés TM, TA, LM, LA. Les mesures au cours de l'expérimentation seront d'ordre zootechniques (ingestion, performances), sanitaire et microbiologiques (suivis du microbiote digestif).

Le protocole tient compte des 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). Ce type d'étude porte sur le modèle animal cible (ovin, ruminants) et ne peut être étudié par des méthodes alternatives in vitro par exemple. On travaille dans des conditions proches des conditions d'élevages commerciaux, 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 zootechniques sera réalisé sur la durée du projet (points limites).

10475 La grande alose et l'alose feinte ont vu leurs populations décliner ces dernières décennies à cause de l'implantation de barrages, de pollutions, de pertes d'habitats, et possiblement du changement climatique. Ces espèces sont classées VU par l'UICN en France, listées en Annexes II et V de la DHFF et en Annexe III de la convention de Berne ; leurs œufs et leurs frayères sont protégés (arr. du 08/12/1988). Pour ces espèces, aucune étude comparative n'a été consacrée à l'écologie des jeunes stades, qui sont soumis à de nombreuses pressions durant leur phase continentale, et dont succès de migration conditionne les effectifs des générations suivantes.

L'objectif est d'acquérir des connaissances relatives aux jeunes stades des deux espèces pour évaluer les capacités de résilience et les possibilités de restauration de leurs populations dans le contexte actuel de changement global.

Ces expérimentations seront conduites sur 8000 larves *A. alosa* provenant d'une structure d'élevage partenaire, et 8000 larves *A. fallax* obtenues après reproduction artificielle de géniteurs capturés

dans le milieu naturel (voir procédure 20180222213542965-v2). Etant donné le manque de connaissances disponibles sur ces espèces, un remplacement par un modèle biologique équivalent ne peut être envisagé. Par ailleurs, les taux de mortalité naturelle des larves pouvant avoisiner les 90%, ces effectifs initiaux peuvent difficilement être réduits pour mener à bien cette étude.

Un premier volet sera consacré à l'utilisation de l'habitat et au régime alimentaire de ces organismes. Dans le milieu naturel, les deux espèces peuvent se retrouver en cooccurrence avant leur dévalaison : il est donc pertinent de comparer leurs préférences au sein d'une même mosaïque d'habitats. Ces préférences seront décrites pour les deux espèces de manière indépendante, dans deux rivières artificielles : une première recevant un lot de 6000 larves *A. alosa*, une deuxième 6000 larves *A. fallax*. Les déversements de ces lots auront lieu 10 jours après éclosion. Chaque rivière artificielle sera agrémentée de structures artificielles faisant varier la profondeur, la pente et la vitesse du courant, offrant ainsi plusieurs habitats aux larves. Le renouvellement se fera avec de l'eau de rivière (naturelle) et de l'eau de forage en continu ; l'alimentation sera assurée par des apports de zooplancton produit dans des bassins adjacents. Les comportements des aloses (répartition au sein des habitats, comportement social, déplacements) seront observés sans manipulation directe durant leurs trois premiers mois de vie. Quelques larves seront toutefois prélevées et analysées pour réaliser un suivi du régime alimentaire des deux espèces. In fine, une description de leurs préférences d'habitat pourrait avoir une forte implication dans des pratiques de gestion de milieux et de restauration.

Un second volet sera dédié à l'évaluation de leur sensibilité aux stress oxythermiques, de 10 à 90 jours post-éclosion. Dans certains bassins versants, ces organismes peuvent être soumis à d'importantes variations de température et de faibles taux d'oxygène (hypoxie). A titre d'exemple, en Garonne aval, les périodes de forte hypoxie ne sont pas rares avec des épisodes de plusieurs jours où le taux de saturation en oxygène est inférieur à 30%, voire de plusieurs heures en-deçà de 20%. Si une étude antérieure a apporté quelques éléments décrivant les limites de tolérance de juvéniles *A. alosa* âgés de 3 mois, aucune étude n'a été réalisée sur d'autres stades de développement ou sur *A. fallax*. Or de telles informations pourraient apporter des éléments explicatifs du succès de migration des aloses, et donc du recrutement des populations. Pour cette étude, des tests de sensibilité à l'hypoxie seront réalisés à différentes températures. La première session de test sera réalisée sur 96 individus *A. alosa* et 96 *A. fallax* âgés de 10 jours qui n'auront pas été déversés dans les rivières artificielles ; les autres sessions de tests seront conduites à 30, 60 et 90 jours sur 288 *A. alosa* et 288 *A. fallax* échantillonnées dans les rivières artificielles grâce à un piège adapté. Chaque enceinte de test contiendra 6 individus ; la moitié des enceintes sera placée en conditions témoin (oxygène constant, 100%), l'autre moitié en hypoxie progressive par paliers. Les observations porteront sur l'apparition de comportements traduisant une insuffisance en oxygène et se poursuivront, dans chacune des enceintes, jusqu'à l'observation d'un comportement défini comme point limite chez un individu, ou jusqu'à 30% de saturation en oxygène si ce comportement n'est pas observé. La durée du test sera limitée à 2h30, avant une remontée rapide du taux d'oxygène à 100% pour évaluer le potentiel de récupération post-stress des aloses dans les 20h suivant le test. Tous les individus seront euthanasiés à l'issue des challenges. Le point limite des tests sera défini à chaque stade de développement par un test prototypique réalisé sur 12 individus de chaque espèce, où la descente en hypoxie sera réalisée jusqu'à la mort de 50% des individus, ou jusqu'à 30% de saturation en oxygène. Si aucun point limite ne peut être décrit avec précision, les challenges oxythermiques n'auront pas lieu.

Un dernier volet sera consacré à l'acquisition de cinétiques de survie et de croissance des deux espèces en conditions optimales. 1000 larves de chaque espèce seront transportées vers une autre station expérimentale et placées en bacs d'élevage offrant des conditions optimales. Les aloses seront suivies jusqu'à 90 jours pour décrire leur comportement, leur croissance et leur survie.

Résumé des effectifs prévus POUR CHACUNE DES DEUX ESPECES et pour l'ensemble des manipulations : effectif initial de 8000 larves, DONT 108 dédiées à la première session de tests de sensibilité aux stress oxythermiques, 1000 aux suivis de croissance/survie, 6000 déversées en rivières artificielles. Les larves restantes servent de « marge de sécurité » pour mener à bien les expérimentations, et seront également déversées dans les rivières artificielles en cas de survie. A

l'issue de ces expérimentations, les individus survivants et n'ayant pas été manipulés seront transférés vers un aquarium partenaire.

10476 Certaines pathologies de l'œsophage comme le cancer (4500 cas/an dont 20% nécessitent une chirurgie lourde), les malformations (atrésie : 500-1000 naissances par an) ou les lésions caustiques liées à l'ingestion de produits corrosifs lors de tentatives de suicide (30 cas/an), nécessitent un remplacement œsophagien.

Il s'agit d'une intervention chirurgicale utilisant l'estomac ou le colon comme substitut œsophagien. Cette chirurgie est lourde avec un taux de complication important, des séquelles fonctionnelles altérant la qualité de vie des patients opérés et un taux d'échec non négligeable.

L'ingénierie tissulaire consiste à créer in vitro un substitut biologique semblable au tissu à remplacer chez un patient, à l'aide d'une matrice et de cellules souches prélevées dans la moelle osseuse du patient.

Cette méthode paraît prometteuse pour le remplacement œsophagien. En effet elle permettrait de créer un substitut sur mesure pour réaliser un remplacement de l'œsophage tout en épargnant le tube digestif intra abdominal réduisant ainsi le taux de complication et les séquelles fonctionnelles. L'ingénierie tissulaire a déjà montré son efficacité chez l'homme dans le remplacement de la vessie ou de la trachée.

Notre équipe a déjà mené à bien 2 protocoles similaires chez le porc dont les résultats étaient encourageants avec néanmoins certaines limites. Forts de cette expérience, nous avons apporté les modifications nécessaires au bon déroulement de ce nouveau protocole. Si les résultats sont satisfaisants un essai clinique chez l'homme pourrait voir le jour dans un futur très proche.

Notre protocole de recherche a pour objectif de déterminer l'efficacité du remplacement de l'œsophage thoracique par un substitut conçu par ingénierie tissulaire chez le porc. Le substitut sera conçu in vitro à partir de cellules souches mésenchymateuses (CSM) prélevées dans la moelle osseuse du porc opéré et de la matrice d'un œsophage prélevé chez un autre porc puis décellularisé. Les résultats analysés seront la capacité de l'animal à s'alimenter après l'opération et le développement d'un tissu œsophagien au niveau du substitut à l'analyse microscopique.

Les Cellules Souches Mésenchymateuses (CSM) possèdent un potentiel de différenciation, des propriétés pro-angiogénique, immuno-modulatrice et anti-inflammatoire, et constituent donc un outil thérapeutique prometteur.

La matrice sera obtenue à partir d'un œsophage de porc décellularisé par un procédé chimique, permettant d'obtenir une matrice extra cellulaire œsophagienne non immunogène pour le receveur. Seule l'expérimentation in vivo permet de répondre à la question posée.

Le porc Mini-Pig est un excellent modèle, fréquemment utilisé dans cette indication, du fait d'une anatomie et une physiologie proche de celle de l'homme.

Nous avons par ailleurs nous-mêmes l'habitude de ce modèle sur lequel toutes nos expérimentations antérieures ont été menées.

Certains paramètres expérimentaux tels que le nombre de cellules à ensemercer et leurs durées de culture ou le procédé de décellularisation de la matrice œsophagienne ont auparavant été mis au point in vitro. Les techniques opératoires ont déjà été évaluées lors d'expérimentations précédentes et lors de travaux de dissections, permettant de réduire le nombre d'animaux utilisés. Deux groupes seront constitués.

Un groupe test recevra un substitut œsophagien composé de matrice acellulaire ensemencé des cellules d'intérêt (CSM), l'autre groupe témoin recevra uniquement la matrice acellulaire.

Les résultats de ce projet permettront de comprendre si les CSM jouent un rôle bénéfique pour la régénération œsophagienne.

Une analyse statistique a été utilisée afin d'estimer le nombre minimum d'animaux nécessaires à l'obtention de résultats significatifs.

Cette étude, prévue sur 2 ans, nécessitera 20 animaux.

Chaque étape de l'expérimentation sera réalisée sous anesthésie générale. Afin 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. Par ailleurs, des points limites suffisamment prédictifs et précoces, motivant l'euthanasie anticipée de l'animal, ont été définis.

10477 La spécialité de radiologie a connu ces dernières années une véritable mutation. En effet, l'imagerie médicale, en plus de son rôle diagnostique possède un rôle à part entière dans la prise en charge thérapeutique du patient. Parmi l'arsenal thérapeutique des radiologues, le Squid et l'alcool sont des agents d'embolisation liquide permettant l'occlusion des vaisseaux, et sont utilisés pour traiter les malformations artério-veineuses (MAV). Ils présentent des caractéristiques différentes quant à leur visibilité sous les rayons X, leur toxicité sur l'organisme, leur effet sur la paroi des vaisseaux et leur profondeur de pénétration dans les vaisseaux fins et distaux.

Il a été récemment décrit dans la littérature que l'on pouvait mélanger ces deux agents (Alcool et Squid) avec comme objectif de combiner leurs avantages complémentaires (embolisant, sclérotique, radio-opaque) et minimiser les effets secondaires indésirables (nécrose, lésions nerveuses, décès) afin d'emboliser à terme les pathologies vasculaires et éviter leur « repousse » après embolisation.

Le but de cette étude est d'évaluer les effets tissulaires et les propriétés d'occlusion d'un vaisseau que posséderait un nouvel agent d'embolisation, l'AlcooSquid18, mélange de Squid 18 (75%) et d'éthanol (25%), dans un modèle porcin par rapport à d'autres agents d'embolisation liquides connus et commercialisés. Toutes les procédures seront réalisées par des radiologues interventionnels et identiques à celles réalisées en pratique clinique courante chez l'Homme. Dix porcs pie-trains (5mois, 40 +/-5 kg) seront inclus dans cette étude, répartis en deux groupes : un groupe Chronique (n=8 porcs) et un groupe Aigu (n=2 porcs) Les animaux du groupe chronique seront embolisés au niveau des artères rénales supérieures de 2ème ordre par ce nouvel agent d'embolisation (AlcooSquid18) ou différents agents connus - éthanol pur, - Squid 18 pur, - Squid 18 mélangé à 25% de DMSO, - Squid 12 mélangé à 25% d'alcool (AlcooSquid12). Chaque rein sera embolisé avec un agent différent, chacun des agents testés sera utilisés sur 3 reins différents. Chaque rein est vascularisé par plusieurs artères, une seule de ces artères rénales sera occluse par un agent d'embolisation testé afin de ne pas toutes les occlure et ainsi conserver une bonne fonction rénale et donc la survie de l'animal. Le groupe aigu représentera la reconstitution de MAV, modèle créé par embolisation d'une artère pharyngienne ascendante et de la carotide commune homolatérale. L'AlcooSquid18 et le Squid 18 seront chacun utilisés sur les modèles du groupe aigu. Des scanners et des études microscopiques seront réalisés dans des délais différents en fonction du groupe : à 90 jours du geste pour les reins du groupe chronique et dans les suites immédiates du geste pour les modèles de MAV obtenus et embolisés pour le groupe aigu. Afin de tenir compte des besoins quotidiens de nos animaux et d'améliorer leur bien-être, les porcs auront une nourriture adaptée, de l'eau de boisson à volonté et seront stabulés en groupe de 2 à 10 pour permettre un contact régulier entre congénères et réduire le stress dans un box de 9m² avec enrichissement (cordes pendantes, chaînes, jouets et balles anti-morsure). Chaque procédure est réalisée sous anesthésie générale, la gestion de la douleur est assurée par l'administration de morphiniques en per-opératoire.

Un contrôle biquotidien en postopératoire est assuré par une personne compétente avec évaluation du bien-être et de la douleur (par grille de score). L'évolution du score permet de noter l'amélioration ou l'aggravation de l'état de l'animal et de prendre des mesures appropriées (points limites).

10478 La b-thalassémie et la drépanocytose sont les maladies génétiques du sang les plus répandues dans le monde. Elles sont causées par la mutation du gène de la bêta globine.

Actuellement, le seul traitement permettant de guérir ces maladies est la transplantation de moelle osseuse. En effet, les cellules souches hématopoïétiques (CSHs) présentes dans la moelle osseuse d'un donneur sain sont capables, lorsqu'elles sont transplantées au patient, de reconstituer tout son système cellulaire sanguin. Cependant, ce genre de thérapie n'est accessible qu'à 25% environ des malades par manque de donneurs compatibles et présente certains risques comme le rejet de greffe ou la maladie du greffon contre l'hôte.

Une alternative est la thérapie génique. Elle consiste à prélever des cellules souches hématopoïétiques (CSHs) du patient, à les cultiver in vitro pour les corriger en y insérant le gène

« médicament » (ici le gène b-globine) grâce à un vecteur thérapeutique et à transplanter ces cellules génétiquement corrigées au patient après avoir détruit au préalable les cellules de sa moelle osseuse (conditionnement myélo-ablatif). Des essais cliniques de thérapie géniques ont démontré la faisabilité ainsi que l'efficacité de cette approche. Cependant, certaines difficultés demeurent. En effet, il est difficile d'obtenir des cellules souches en quantité suffisante, de ne pas corrompre leurs propriétés biologiques durant le processus de transduction (phase durant laquelle les cellules sont cultivées *in vitro* et qui est nécessaire à l'introduction du « gène médicament ») et de ne pas altérer les chances de reprise hématopoïétique tout en corrigeant le maximum possible de cellules. Il est par ailleurs nécessaire d'injecter une quantité suffisante de cellules pour limiter le temps, après transplantation chez le patient, durant lequel celui-ci a peu de cellules sanguines (aplasie médullaire).

Le projet consiste donc à étudier l'effet de différents vecteurs thérapeutiques en jouant par exemple sur les gènes thérapeutiques, ou des gènes activateurs de la prolifération cellulaire. L'objectif est d'améliorer les protocoles de correction et de transplantation de CSHs dans le cadre des procédures de thérapie génique. Toutes nos hypothèses sont initialement testées sur des cellules cultivées *in vitro*. Le recours à un organisme modèle est toutefois nécessaire pour obtenir l'information concernant la capacité des cellules génétiquement corrigées à reconstituer le système hématopoïétique, et de corriger ainsi la pathologie à long-terme. Nous utiliserons la souris comme modèle : il existe des modèles murins de la drépanocytose et de la bêta-thalassémie. Comme chez les patients, les CSHs génétiquement modifiées seront greffées aux souris ayant préalablement subi une myélo-ablation. Nous analyserons la proportion de cellules sanguines corrigées, le niveau d'expression du gène thérapeutique et la correction du phénotype de la maladie. Les animaux utilisés dans cette étude sont élevés à des fins scientifiques dans des établissements agréés. Dans le cadre de ce projet de 5 ans qui permettra de tester plusieurs nouveaux vecteurs et protocoles de transduction des CSHs ainsi que des approches de sélection des cellules transduites, le nombre maximum d'animaux est de 1800. Ce nombre a été déterminé grâce aux données de la littérature et à notre expérience, et réduit au maximum tout en garantissant la fiabilité des résultats. Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie ont été définis et validés par le vétérinaire de façon à éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux. Le suivi quotidien et l'application de critères d'arrêts appropriés sont prévus afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus. Les animaux sont hébergés en groupe et bénéficient d'un enrichissement de leur milieu nécessaire à leur bien-être.

10479 L'objectif de notre étude est de tester l'effet sur le fonctionnement cérébral de molécules en développement pour le traitement de maladies neurodégénératives entraînant des déficits de mémoire. Pour cela, nous allons tester l'effet de ces candidats thérapeutiques sur l'activité électrique cérébrale par la technique d'électrophysiologie *in vivo*. L'effet des composés administrés par voie intraveineuse chez le rat sera évalué sur trois paramètres électrophysiologiques :

-l'activité des neurones situés dans une structure impliquée dans l'apprentissage et la mémoire, appelée hippocampe : cette activité se quantifie par la mesure du taux de décharge des neurones.

-la plasticité synaptique, c'est-à-dire la modulation des connexions entre les neurones dans le cerveau (les synapses étant les points de contacts entre les neurones), phénomène depuis longtemps considéré comme un élément fondamental de la mémoire. La plasticité se quantifie par la mesure de l'efficacité synaptique, appelée potentialisation à long terme.

-l'activité corticale oscillatoire mesurée par électrocorticogramme : l'activité globale des neurones du cortex cérébral oscillent selon certains rythmes, à différentes fréquences (de 0 à 150 Hz). Ces oscillations reflètent l'état de vigilance et les différentes étapes de traitement de la mémoire.

Nous utiliserons pour cette étude 60 rats à l'âge adulte.

Ce projet se justifie pleinement d'un point de vue scientifique et sera réalisé dans le respect éthique de la règle des 3R (remplacement, réduction et raffinement) :

-remplacement : l'étude du système nerveux, de par sa complexité d'organisation, de développement et de fonctionnement, ne saurait être envisagée hors du contexte intégré retrouvé au sein de l'organisme entier. En ce sens, seules des approches menées chez un modèle animal, certes simplifié, peuvent améliorer la connaissance du cerveau humain et son développement, et

ainsi aboutir au développement de nouvelles thérapies pour des pathologies neurodégénératives induisant des déficits d'apprentissage et de mémoire. Nos expérimentations seront réalisées chez le rat; ces rongeurs, de petite taille et d'élevage facile, possèdent un système nerveux dont le développement est extrêmement proche de celui du système nerveux humain, et dont l'organisation, certes simplifiée, est suffisamment complexe.

-réduction : le nombre de rat a été réduit autant que possible, tout en étant suffisant pour l'obtention de résultats exploitables. Sur un même animal, nous pourrions enregistrer simultanément différents paramètres électrophysiologiques, impliqués dans le phénomène de mémorisation. L'évaluation du nombre d'animaux nécessaire a été effectuée par l'utilisation du programme GPower 3.1. Les résultats seront analysés avec le logiciel GraphPad Prism. Nous adapterons les tests statistiques en fonction de la distribution des observables, qu'elle soit normale ou non.

-raffinement : les animaux seront hébergés dans des cages avec portoirs ventilés. Boisson et nourriture seront disponibles ad libitum. Avant les expériences, les animaux seront acclimatés pendant une période d'une semaine. Pendant l'étape de chirurgie nécessaire pour le placement des électrodes permettant l'enregistrement des données électrophysiologiques, plusieurs mesures seront mises en place afin de réduire au maximum la douleur : utilisation d'anesthésiques et d'analgésiques locaux, application de gel ophtalmique afin d'éviter le dessèchement de la cornée, maintien d'une température constante par un tapis chauffant. Après l'étape de chirurgie les animaux seront isolés afin d'éviter tout dommage au niveau des implants ou l'apport de germes susceptibles de provoquer une infection. Leur milieu sera enrichi avec du papier ouate et des bâtons à mâcher. Le bien-être des animaux sera attentivement suivi quotidiennement par l'établissement de fiches d'évaluations, permettant ainsi de détecter toute souffrance, angoisse ou signes de stress pour les animaux. Ces fiches permettront par ailleurs de déterminer des points limites précoces et adaptés. En cas de souffrance de l'animal, la surveillance sera rapprochée et les animaux seront soignés en fonction de la sévérité de la douleur observée. Si les signes de souffrance persistent, les animaux seront euthanasiés.

10480 L'épilepsie est une maladie neurologique affectant près de 1% de la population mondiale, soit près de 600000 patients en France. L'utilisation de molécules antiépileptiques reste aujourd'hui le seul moyen pour stopper la survenue des crises. Mais, pour un tiers des patients, dits pharmacorésistants, les traitements disponibles ne permettent pas de stopper la totalité des crises. Les patients pharmacorésistants souffrent de surcroît de troubles graves associées aux crises, tels qu'une exacerbation de l'anxiété et des troubles de l'apprentissage et de la mémoire. Le plus souvent, ces épilepsies pharmacorésistantes surviennent après une agression cérébrale sévère, telle qu'un traumatisme crânien, une méningite, ou encore un état de mal épileptique (EME). Il apparaît donc primordial de trouver des stratégies permettant de bloquer, après une telle agression cérébrale, la transformation du tissu sain en tissu épileptique, ou, à défaut, de réduire la sévérité des crises et des troubles associés. Dans un contexte où de nombreuses pistes thérapeutiques ont été explorées, mais sans succès, celle ciblant les processus de neuro-inflammation apparaît aujourd'hui comme une voie porteuse d'espoir. En effet, il a été montré que les médiateurs inflammatoires, notamment ceux portés par les cellules sanguines qui pénètrent dans le cerveau après une agression cérébrale sévère, étaient impliqués dans le développement de l'épilepsie. Pour contrer cette inflammation, des anti-inflammatoires ont été dans un premier temps utilisés. Néanmoins, ces médicaments génèrent de nombreux effets secondaires incompatibles avec une administration de longue durée.

L'objectif de ce projet de recherche préclinique est de développer une nouvelle approche thérapeutique pour limiter l'inflammation cérébrale délétère associée au développement de l'épilepsie, cela grâce à l'utilisation de cellules souches adultes dites « cellules souches mésenchymateuses » (CSM). Ces CSM sont retrouvées en grand nombre dans la moelle osseuse ou le tissu adipeux. L'intérêt de ces cellules réside notamment dans le fait qu'elles n'entraînent pas de réaction de rejet après transplantation, et qu'il pourra donc être envisagé d'obtenir ces CSM chez des individus sains de sorte à réaliser des stocks importants, alors immédiatement disponibles pour qu'elles soient greffées chez des sujets victimes d'agressions cérébrales graves. La voie d'administration intranasale est l'une des voies d'accès privilégiée pour faire parvenir des molécules

ou des cellules au niveau cérébral. C'est donc cette voie que nous avons choisie dans notre protocole.

Ainsi, ce projet de recherche sera réalisé chez le rat, l'épilepsie étant provoquée par l'induction pharmacologique d'un EME. Il sera organisé en trois temps :

- Dans un premier temps, nous rechercherons les conditions qui favorisent, après leur transplantation précoce, la migration des CSM dans les régions cérébrales où sont générées les crises ;

- Dans un second temps, nous étudierons l'effet des CSM sur l'inflammation aux niveaux cellulaire et moléculaire ;

- Dans un troisième temps, nous évaluerons si ces CSM permettent de bloquer la transformation épileptique du tissu cérébral ou, à défaut, de réduire la fréquence des crises et les troubles associés à l'épilepsie.

Pour répondre aux objectifs du projet, il n'est pas possible de remplacer le recours à l'expérimentation animale car aucune méthode alternative ne permet aujourd'hui de modéliser de manière fiable l'effet des CSM sur les phénomènes inflammatoires cérébraux portés par les cellules sanguines ayant traversé les capillaires sanguins, et sur les conséquences comportementales associées à l'épilepsie.

L'utilisation du modèle d'épilepsie induite chez le rat pubère mâle Sprague-Dawley est privilégiée et se justifie par le fait que le rat fait partie des espèces les plus utilisées dans le domaine de la recherche préclinique en épilepsie, notamment dès lors que des études comportementales et électrophysiologiques doivent être couplées. L'épilepsie sera induite chez des rats issus d'un éleveur agréé, à l'âge de 42 jours. Dans ce modèle, la phase de transformation du cerveau sain en cerveau épileptique, appelée « épileptogenèse », dure 2 semaines. Puis, des crises récurrentes et spontanées apparaissent et sont associées aux premiers troubles comportementaux : c'est la phase chronique. Le phénotype induit chez les rats modélise les troubles et symptômes observés chez les patients épileptiques, permettant de mesurer aux niveaux moléculaire, cellulaire et comportemental les effets de CSM administrées pendant l'épileptogenèse.

Les rats seront hébergés dans un milieu enrichi avec de la laine de peuplier et auront un accès ad libitum à l'eau et à la nourriture. Ils feront l'objet d'une surveillance quotidienne et des mesures de prévention et de prise en charge de la douleur seront associées à la réalisation de chaque procédure. Etant donné que les molécules à visée anti-inflammatoire bloquent le développement de l'épilepsie, elles ne pourront pas être administrées. Ainsi, pendant la semaine qui suit l'EME, les animaux seront surveillés quotidiennement, afin de détecter tout signe clinique de douleur. L'agent pharmacologique utilisé pour induire l'EME provoquant aussi un ralentissement du transit intestinal, l'abdomen sera massé deux fois par jour pour stimuler la motilité intestinale, et ce jusqu'à l'apparition de fèces dans la cage. Etant donné que l'EME induit dans les premiers jours une diminution de la prise alimentaire, le poids des rats sera également mesuré et les rats seront réhydratés au biberon et nourris par les expérimentateurs. Au 5^{ème} jour post-EME, si aucune reprise de poids n'est constatée chez certains rats (moins de 2% des rats), ils seront euthanasiés selon une procédure recommandée par la réglementation et éthiquement acceptée.

Cette étude prévue sur 5 ans nécessitera l'utilisation de 318 rats : cet effectif a été déterminé sur la base de tests statistiques afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en permettant d'avoir des conclusions statistiquement fiables. Si ce projet montre que l'administration des CSM permet de prévenir l'apparition de l'épilepsie et la transformation du cerveau sain en cerveau épileptique, il pourra être envisagé très rapidement une transposition chez le patient pour un usage thérapeutique.

10481 L'obésité et le dysfonctionnement du tissu adipeux sont associés à une augmentation du diabète de type 2 et des maladies cardiovasculaires. Le traitement de l'obésité est considéré comme un objectif thérapeutique important dans la prise en charge de ces maladies car une réduction même légère du poids corporel est associée à leur amélioration. La capacité des dépôts de graisse à dissiper l'énergie a suscité un intérêt croissant pour développer des moyens d'activer la dépense énergétique et de lutter contre l'obésité et ses maladies associées. Notre projet vise à identifier et à caractériser de nouveaux acteurs permettant de moduler directement la fonction du tissu adipeux

et notamment la dépense énergétique dans un contexte physiopathologique. Pour l'étude du métabolisme, seule une approche intégrée par l'expérimentation animale, mimant le développement de l'obésité, ou mettant en place un protocole induisant les dépenses énergétiques, est envisageable et ne peut être substituée par des analyses réalisées uniquement in vitro.

Dans ce projet d'une durée de 5 ans, nous utiliserons plusieurs lignées de souris génétiquement modifiées et dont le phénotype n'est pas dommageable. Le nombre de souris utilisées sera de 224. Pour développer l'obésité chez ce modèle murin, les souris seront nourries avec un régime hyperlipidique, mimant le régime alimentaire riche en graisses chez l'homme, et nous analyserons l'impact de notre gène d'intérêt sur les changements des paramètres métaboliques en réalisant des tests fonctionnels dont certains sont non-invasifs.

Pour induire la production de chaleur chez nos souris, nous aurons recours à un modèle de thermogénèse induite par une exposition des souris à 4°C. Notre projet met aussi en jeu l'administration de substances pharmacologiques pour valider in vivo des cibles thérapeutiques préalablement identifiées par des études in vitro. Pour respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum permettant une analyse statistique efficace des résultats d'après nos données antérieures. Des méthodes alternatives de culture cellulaire seront utilisées pour étudier les mécanismes moléculaires sous-jacents. De plus, afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux, une surveillance journalière sera réalisée en respectant des points limites bien définis, entraînant l'euthanasie anticipée de l'animal si nécessaire. A terme, les résultats de ce projet devraient permettre d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour lutter contre l'obésité et ses maladies associées, en ciblant la dépense énergétique, et non pas seulement les calories ingérées.

10482 L'incidence croissante de l'obésité considérée comme une épidémie mondiale est étroitement liée aux maladies cardiovasculaires et au diabète de type 2. Dans ce contexte, l'obésité constitue le principal facteur de risque pour le développement de ces maladies et son traitement est considéré comme un objectif thérapeutique important car une réduction même légère du poids corporel est associée à une amélioration de ces maladies.

L'obésité est associée à la résistance aux hormones telles que la leptine qui est une cytokine circulante sécrétée par le tissu adipeux blanc. Au niveau central, la leptine contrôle la prise alimentaire, la dépense énergétique et la distribution des graisses. Elle contrôle aussi la sensibilité à l'insuline, l'oxydation des acides gras libres et la lipolyse en périphérie. La résistance à cette hormone affaiblit les fonctions centrales et périphériques normales de la leptine, ce qui entraîne une diminution de la fonction neuroendocrine et de la sensibilité à l'insuline, un déséquilibre de la régulation de l'énergie et des perturbations du métabolisme des lipides, conduisant au développement de l'obésité et du diabète.

Notre projet vise à identifier et à caractériser de nouveaux acteurs permettant de moduler directement la sensibilité à la leptine dans un contexte physiopathologique. Pour l'étude du métabolisme, seule une approche intégrée par l'expérimentation animale, mimant le développement de l'obésité, est envisageable et ne peut être substituée par des analyses réalisées uniquement in vitro. Dans ce projet d'une durée de 3 ans, nous utiliserons une lignée de souris génétiquement modifiée présentant une délétion de notre gène d'intérêt et dont le phénotype n'est pas dommageable. Le nombre de souris utilisées sera de 72. Pour développer l'obésité chez ce modèle murin, les souris seront nourries avec un régime hyperlipidique, mimant le régime alimentaire riche en graisses chez l'homme, et nous analyserons l'impact de notre gène d'intérêt sur les changements des paramètres métaboliques en réalisant des tests fonctionnels dont certains sont non-invasifs. Pour respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux utilisés sera réduit au minimum permettant une analyse statistique efficace des résultats d'après nos données antérieures. Des méthodes alternatives de culture cellulaire seront utilisées pour étudier les mécanismes moléculaires sous-jacents. De plus, afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux, une surveillance journalière sera réalisée en respectant des points limites bien définis, entraînant l'euthanasie anticipée de l'animal si nécessaire. A terme, les résultats de ce projet permettront le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour prévenir et traiter l'obésité et ses complications.

10483 Les maladies chroniques du foie représentent la principale cause de développement du carcinome hépatocellulaire et sont associées au syndrome métabolique (surpoids, diabète, obésité, hypertension, dyslipidémie). Le spectre de ces complications hépatiques (NAFLD : Non Alcoholic Fatty Liver Disease) va d'une stéatose simple (foie gras), à la stéatohépatite (Non Alcoholic Steato Hepatitis : NASH), puis à la fibrose, voire la cirrhose et à l'hépatocarcinome. Malgré l'importance clinique de ces maladies chroniques du foie, aucun traitement pharmacologique efficace n'est actuellement disponible.

La mise en place d'une inflammation à bas bruit dans le foie joue un rôle crucial dans le développement des maladies chroniques dans cet organe. Notre équipe de recherche s'intéresse à la protéine kinase SYK, qui joue un rôle central dans la signalisation intracellulaire au cours des réponses inflammatoires médiées en outre par les macrophages.

Nos données préliminaires montrent que l'expression hépatique de SYK est fortement augmentée avec l'inflammation hépatique et corrèle avec les caractéristiques de la NAFLD (stéatose, inflammation et souffrance hépatique) chez les patients obèses et dans nos modèles murins de stéatohépatite. L'objectif de ce projet est d'évaluer le potentiel thérapeutique d'inhibiteurs de la protéine kinase SYK au cours de la stéatohépatite.

Pour satisfaire au remplacement, nous réaliserons des études préliminaires in vitro sur des lignées cellulaires. Cependant, il nous est nécessaire de réaliser des études in vivo car les études in vitro ne permettent pas de reproduire les interactions complexes qui existent entre les différents organes et entre les différents types tissulaires.

Pour satisfaire à la 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. Nous prévoyons d'utiliser 480 souris sauvages C57BL/6 sur une période de 5 ans.

Pour satisfaire au raffinement, nous serons particulièrement attentifs à tout changement physique ou de comportement. Leur bien-être sera scrupuleusement pris en compte dans toutes les procédures en termes de conditions d'élevage (température, hygrométrie), d'hébergement avec présence de tige en coton et d'igloo dans les cages. Le suivi sanitaire quotidien assuré par les animaliers auquel s'ajoutent les visites régulières des expérimentateurs (au moins une fois par semaine en fonction des procédures) nous permettra de détecter précocement tout signe de stress ou de douleur et d'appliquer les points limites que nous avons définis pour chaque procédure.

10484 Le foie est un organe central dans la régulation du métabolisme, en effet chez l'homme comme chez la souris, il va permettre de stocker les nutriments issus de l'alimentation sous diverses formes afin de constituer une réserve d'énergie. Afin de réguler finement le métabolisme énergétique dans le temps, le foie est soumis au contrôle du rythme circadien. Il s'agit d'un rythme défini par l'alternance veille (période d'activité) /sommeil (période d'inactivité). Le rythme circadien constitue alors un cycle d'une durée de 24 heures et prend son origine à la fois au niveau de notre horloge interne (dirigée par le système nerveux central) mais aussi au niveau de l'environnement. Cette horloge circadienne procure alors un avantage évolutif en anticipant les événements prédictibles (prise de nourriture, heure du coucher). Il est démontré que des perturbations de l'horloge (manque de sommeil, travail posté,) ont des conséquences néfastes sur notre santé. En effet des liens sont étroitement établis entre une perturbation chronique de l'horloge circadienne et l'altération du métabolisme (obésité, diabète de type 2, insulino-résistance). L'objectif de ce projet est de mieux comprendre les mécanismes qui régissent cette relation étroite et permettre de dissocier la part de l'horloge, de la prise alimentaire pour une meilleure compréhension de la physiologie du foie. Nous allons étudier si la voie de l'insuline, hormone sécrétée durant la prise alimentaire, est essentielle dans la régulation de l'horloge du foie. Dans ce projet, nous utiliserons un modèle de souris insensibles à l'insuline puisqu'elles seront génétiquement modifiées et n'exprimeront plus un gène impliqué dans la voie de l'insuline et ceci uniquement dans le foie. Les souris génétiquement modifiées mais aussi des souris contrôles subiront une injection de Tamoxifène par voie intrapéritonéale sur 3 jours consécutifs afin d'induire l'invalidation ou non (souris contrôles) de notre gène d'intérêt. Ces souris seront ensuite pendant deux semaines nourries ad libitum. Puis, certaines de ces souris subiront une restriction alimentaire, l'accès de la prise alimentaire se fera durant le

temps de sommeil (soit en journée au lieu de la nuit). En fin de projet, soit 4 semaines après, les souris seront euthanasiées afin de collecter les organes pour diverses analyses. Les souris invalidées pour le gène d'intérêt auront une altération de la physiologie puisqu'elles seront résistantes à l'insuline.

Pour cette étude, aucune méthode substitutive n'est possible, puisque nous étudions le rythme circadien, le dialogue entre le système nerveux (où règne l'horloge interne) et le foie est indispensable. De plus l'étude complète du métabolisme nécessite l'interaction entre le foie et les tissus gras. Le choix de l'espèce est la souris car il n'existe que ce modèle pour l'invalidation de notre gène d'intérêt.

Pour ce projet, nous utiliserons 432 souris sur une durée de 2 ans, nombre nécessaire et minimal pour l'obtention de résultats valides et statistiquement interprétables. De plus, nous utiliserons des souris génétiquement proches (même fond génétique et même âge) permettant de diminuer la variabilité des résultats et donc de réduire le nombre d'animaux utilisés dans un même groupe d'expérimentation.

Pour un meilleur raffinement, les souris seront élevées dans les conditions optimales (température ambiante contrôlée, environnement calme, disponibilité en libre-service de nourriture et d'eau, les habitats sont enrichis avec de la cellulose et des petites maisonnettes). Hormis lors de la restriction alimentaire et des changements de cages, les souris ne seront pas manipulées afin de réduire tout inconfort ou stress. Les animaux seront quotidiennement observés (apparence physique externe, changement de comportement) et des points limites seront établis afin de prévenir et de remédier à toute douleur, stress ou angoisse chez l'animal. Si un point limite est atteint (perte de poids, dépression, etc.), l'animal sera retiré de l'expérimentation pour être euthanasié. Les résultats obtenus nous permettront de mieux comprendre la physiologie du foie dans son ensemble. Cela pourrait amener à reconsidérer différemment le développement de pathologies (obésité, diabète.) et également le développement des stratégies thérapeutiques.

10485 La gamétogenèse est un processus spécialisé conçu pour produire les gamètes. Les histones sont des molécules importantes pour la compaction de l'ADN, qui peuvent être modifiées par l'ajout de groupements chimiques (acétylation ou méthylation). L'acétylation des histones crée un état décondensé de la chromatine afin que les histones puissent être remplacées ou déposées. L'acétylation des histones est également essentielle pour la réparation des dommages de l'ADN. Le niveau d'acétylation des histones dépend de l'activité de 2 familles d'enzymes spécifiques : CAT et HDAC.

Le panobinostat, inhibiteur de HDAC, peut avoir un impact sérieux sur l'acétylation des histones et peut provoquer des anomalies dans les cellules germinales et être la cause d'une réduction de la fertilité ou d'aneuploïdie (nombre anormal de chromosomes).

Le taux d'acétylation des histones étant élevé dans les cellules tumorales, le ciblage des HDAC est une voie prometteuse pour le traitement du cancer car l'inhibition des HDAC détruit préférentiellement les cellules cancéreuses. Récemment, le panobinostat (Farydac®, LBH589) a été approuvé par la Food and Drug Administration (FDA) des États-Unis comme médicament pour traiter le myélome multiple. Il est en cours de test clinique pour une gamme de tumeurs hématologiques et solides.

Le panobinostat provoque des effets d'arrêt du cycle cellulaire. L'étude des effets du panobinostat sur des processus physiologiques normaux tels que la reproduction est d'une grande importance. Les hommes et femmes qui prennent du panobinostat sont normalement en âge de procréer. Nous avons émis l'hypothèse que les changements dans le niveau d'acétylation, au cours du traitement de femelles gestantes, modifieront l'état épigénétique des cellules germinales embryonnaires et par conséquent, l'état épigénétique de toutes les cellules germinales des animaux à naître.

Pour prouver notre hypothèse, sur un modèle de souris consanguines, nous allons traiter des femelles gestantes pendant le développement, entre le 6ème et le 15ème jour embryonnaire. Les mâles nés seront analysés à 12 jours, stade où les cellules germinales sont dans un état situé au début de la spermatogénèse, puis à 36 jours, qui correspond à une spermatogénèse complète.

Les objectifs de notre étude sont de révéler les effets du panobinostat, inhibiteur HDAC, sur le système reproducteur. Nous aimerions :

- 1) savoir comment le panobinostat affecte l'étape clé de la gamétogenèse, la méiose;
- 2) connaître les effets du panobinostat sur l'épigénétique des spermatocytes;
- 3) connaître l'effet global du panobinostat sur la spermatogenèse;

Résultats attendus : Nous allons révéler les mécanismes d'action du panobinostat sur les cellules germinales, en particulier sur le stade critique et fragile de la méiose. Nos données sont importantes pour connaître les effets négatifs du panobinostat sur le système reproducteur. Puisque le médicament fait l'objet de nombreux essais cliniques, nous devons révéler son mécanisme d'action et ses effets sur les processus normaux.

Ce projet de recherche a été pensé en respectant au mieux la règle des 3R :

-Remplacement : La méiose, le processus de production des gamètes, est complexe et ne peut pas être reproduit en culture cellulaire.

-Réduire : Le nombre d'animaux est choisi en fonction du nombre nécessaire pour être statistiquement significatif et scientifiquement irréprochable pour valider les données obtenues à la fin de la procédure; Pour ce projet nous prévoyons un maximum de 840 souris.

-Raffinement : Les animaux seront hébergés dans une structure agréée qui tient compte de l'éthique animal et assure le suivi quotidien, si des réactions apparaissent (points limites), nous arrêterons le traitement. L'hébergement se fait dans des cages de groupes de 2-3 animaux. La procédure de gavage est réalisée par un personnel expérimenté et avec une sonde adaptée. La molécule panobinostat est diluée dans de l'eau. Cette intervention ne provoque pas de douleur chez l'animal.

10486 La peur est une réponse adaptative et transitoire exprimée lorsqu'un sujet est exposé à un danger. Cependant, la peur peut devenir élevée et continue en absence de danger, devenant alors un trouble psychiatrique dénommé anxiété. Cette pathologie constitue la condition psychiatrique possédant la plus forte prévalence. Selon un rapport de l'Institut de Veille Sanitaire (InVS) de 2007, 10,7% des hommes et 14,5% des femmes en France présentent des troubles d'anxiété généralisés. L'anxiété représente ainsi un coût sociétal et économique majeur.

Une hypothèse propose que des dysfonctionnements des circuits impliqués dans l'encodage de la valence sont à l'origine de l'anxiété malade. Le projet vise à définir l'implication de l'encodage de la valence dans les troubles anxieux, au travers de l'étude d'une région cérébrale spécifique qui a été impliquée dans les troubles anxieux chez l'humain : le cortex insulaire. Au travers d'analyses de la connectivité, de manipulations et d'enregistrements de l'activité neuronale, nous avons pour objectif de mettre en évidence les altérations des circuits d'encodage de la valence dans un modèle d'anxiété chez la souris.

Ce projet a pour but de mettre en évidence des altérations du fonctionnement de circuits neuronaux contrôlant le niveau d'anxiété, afin de pouvoir envisager des stratégies de restauration de ces altérations chez les patients atteints de troubles anxieux.

Remplacer : Le projet porte sur une analyse de la connexion des neurones et de leurs propriétés de transmission d'informations au cours du comportement. Par conséquent cette procédure doit être effectuée chez des animaux vivants. Des méthodes telles que la culture cellulaire ne permettent pas la quantification des connexions neuronales ou la mesure de l'activité en réponse à une stimulation sensorielle in vivo.

Réduire : Nous avons réduit au strict nécessaire le nombre d'animaux afin d'obtenir une analyse fiable (le nombre d'animaux estimé permet d'effectuer des tests statistiques) et complète de la connectivité et de l'activité de la région cérébrale d'étude. Nous utiliserons ainsi 1152 animaux sur cinq ans.

Raffiner : Avant la mise en place du modèle d'anxiété, les animaux seront hébergés en cages collectives, afin de limiter le stress dû à l'isolement. Les cages seront également enrichies en nids en coton. Une surveillance particulière sera adressée aux animaux en période péri-opératoire. L'acte chirurgical sera effectué dans des conditions de propreté maximales. Des antibiotiques et analgésiques seront administrés en cas d'infection ou de douleur.

10487 Aujourd'hui, la chimiothérapie et la radiothérapie restent les traitements de référence dans la majorité des cas de cancer. Or l'efficacité de ces traitements est dépendante de la réponse immunitaire anti-tumorale qu'ils déclenchent. Grâce à un modèle informatique prédictif et grâce aux

découvertes récentes sur les mécanismes de la mort cellulaire immunogène, nous avons identifié plusieurs agents potentiellement inducteurs de la mort cellulaire immunogène, ce que nous avons confirmé par des expériences *in vitro*.

Il est maintenant indispensable de valider leur effet anti-cancéreux à l'échelle de l'organisme entier, de façon à prendre en compte les interactions humorales et cellulaires essentiellement dans le cadre de la réponse immune, d'où la nécessité d'utiliser un modèle animal. Ce projet pourra ainsi permettre l'émergence de nouveaux traitements contre le cancer. Ce projet ayant pour objectif de tester l'efficacité de traitements anti-cancéreux et de confirmer qu'ils agissent via une activation du système immunitaire, nous avons besoin d'un modèle mimant le plus fidèlement possible l'environnement tumoral et le système immunitaire. Comme il est actuellement impossible de reconstituer un système immunitaire *in vitro/ex vivo* du fait de sa complexité, il est absolument nécessaire d'avoir recours à un modèle *in vivo*.

De plus, il permettra de mieux comprendre les mécanismes de mort cellulaire immunogène et ainsi d'identifier de nouveaux biomarqueurs. La détermination de biomarqueurs peut ensuite permettre la mise en place de thérapies ciblées, en complément des chimiothérapies immunogènes afin d'augmenter leur efficacité. Ce projet d'une durée de 3 ans prévoit des expériences de croissances tumorales chez la souris (724).

Les contraintes pour les animaux seront des greffes de tumeurs par voie sous-cutanée, en gardant des volumes faibles.

Le nombre d'animaux par groupe a été calculé à l'aide d'un modèle statistique dans le but d'utiliser le minimum de souris permettant d'observer une différence statistiquement significative après un calcul de puissance. Le nombre de groupes proposé inclut les groupes contrôles nécessaires. Les expérimentations seront par ailleurs regroupées au maximum afin de réduire le nombre d'animaux contrôles (regroupement de contrôles pour des bras d'étude multiples). L'étude est divisée en plusieurs procédures séquentielles et sera arrêtée si une des procédures invalide l'hypothèse de travail ; le nombre de souris sera ainsi diminué. Par ailleurs, une veille bibliographique constante sera faite pour éviter toute expérimentation déjà rapportée dans la littérature. Les expérimentations seront réalisées dans le souci constant de réduire au maximum l'inconfort et la souffrance des animaux. Au cours de l'expérimentation, les animaux seront hébergés en tout temps dans le respect de leur bien-être. Concernant l'enrichissement du milieu, les animaux disposeront de coton dans les cages ainsi que de matériel tel que des maisons en carton. Les animaux seront acclimatés pendant une semaine avant le début de l'expérimentation. La surveillance régulière permettra le suivi clinique et du comportement afin de donner aux animaux le plus tôt possible les soins nécessaires.

10488 La dirofilariose canine à *Dirofilaria immitis* est une helminthose à transmission vectorielle, ayant un potentiel zoonotique. Jusqu'à présent, peu de modèles expérimentaux ont été développés pour son étude. Ils se limitent aux animaux de compagnie (chiens, chats et furets). Or, ces modèles expérimentaux ont permis de mettre, entre autres, en évidence l'efficacité de certaines substances thérapeutiques et préventives contre cette maladie. Mais, avec le nouvel aspect de la résistance aux traitements et des échecs de prévention, les paradigmes de lutte doivent être changés. D'ailleurs, il a été décrit que toutes les molécules se trouvant actuellement sur le marché et sous toutes leurs formes d'administration se sont avérées inefficaces dans au moins une étude. Il semble que, même si la résistance affecte toutes les lactones macrocycliques (le seul traitement spécifique), des causes liées à l'organisme hôte, des différences au niveau des principes actifs, des doses et des formulations des produits disponibles peuvent aboutir à des taux d'échec variés. Ce projet vise à développer des modèles expérimentaux (gerbilles, cobayes et lapins) de la dirofilariose à *Dirofilaria immitis*, afin d'évaluer de nouvelles pistes préventives et thérapeutiques. En effet, nous cibons le décryptage d'un certain nombre d'étapes du cycle parasitaire tel que l'effet de l'inoculation naturelle par le moustique mais aussi les interactions de l'hôte avec les différentes formes parasitaires. Cette question ne peut être abordée qu'*in vivo* car il n'est pas possible d'étudier l'interaction hôte parasite *in vitro*. Pour ce faire, nous projetons d'utiliser un total de 30 animal (10 gerbilles, 10 cobayes et 10 lapins), ce nombre est issu d'une estimation statistique, dont la puissance est fixée à 0,8 et le risque de première espèce (α) à 0,05. Nous veillerons, également

à ce que la réalisation de ce projet soit conforme aux exigences de raffinement liées à l'expérimentation animale. Les gerbilles et les cobayes seront hébergés, soit en groupe constitués par des individus de la même espèce, soit individuellement pour les sujets manifestant de l'agressivité envers ses congénères, dans des cages enrichies (abris, surface de repos) placées dans des portoirs ventilés, et des cages individuelles munies d'une plateforme non métallique pour les lapins, l'alimentation et l'abreuvement sont à volonté. Les animaux seront surveillés quotidiennement et seront manipulés par la même personne. L'induction de l'infection sera effectuée sous anesthésie générale et suivie à long terme par une évaluation rigoureuse de la douleur grâce à une grille d'évaluation (grille de Morton et Griffiths 1985) et tout signe de douleur entraînera l'arrêt immédiat de l'expérimentation.

10489 La leishmaniose canine (CanL) est une maladie parasitaire zoonotique très répandue dans le monde, sévissant de façon endémique dans tous les pays du bassin méditerranéen. Son contrôle est d'importance croissante pour la santé humaine et animale. En fait, la meilleure stratégie de contrôle serait un vaccin efficace. Un tel vaccin ne réduirait pas seulement le nombre de cas de la CanL mais aussi l'incidence chez l'homme. Plusieurs vaccins candidats ont été testés au cours des deux dernières décennies avec des taux variables de succès chez le chien. Il n'y a pas de réponse immunitaire nette dans la CanL, mais il est bien établi qu'une réponse Th1 spécifique, dominante et appropriée au parasite est le résultat le plus souhaitable pour la protection.

Dans ce travail, et par un essai sur modèle murin dans l'animalerie (niveau de sécurité biologique 3), nous prévoyons d'optimiser le protocole de vaccination et évaluer l'efficacité de deux vaccins canins anti-leishmaniens commercialisés dans la prévention de la maladie.

D'autre part, le traitement de la CanL représente encore un défi pour tous les vétérinaires. Au cours des dernières décennies, de nombreux médicaments et divers schémas thérapeutiques ont été essayés, la plupart sont d'une efficacité limitée. Aussi, dans un deuxième temps et toujours sur des souris, nous voudrions évaluer l'efficacité de ces vaccins dans le traitement (vaccinothérapie), seuls ou en association, avec d'autres molécules chimiothérapeutiques.

Le modèle animal est incontournable dans les essais thérapeutiques et vaccinaux ; les études in vitro ne permettent pas le jugement sur l'efficacité d'un vaccin ou bien d'un médicament. Nous allons procéder d'une manière à réduire au maximum le nombre d'animaux, leur douleur et la souffrance pouvant survenir lors de l'expérimentation et veiller au bien-être animal. Dans cette étude nous allons utiliser 75 souris qui seront réparties en lots selon nos objectifs, cela nous permettra par la suite de tirer des conclusions pertinentes sur les vaccins et/ou les traitements.

Les animaux seront hébergés dans des cages appropriées à raison de 4 à 6 souris/cage. La nourriture et l'eau sont à volonté. Des dômes sont mis à disposition dans chaque cage pour enrichir le milieu. Un contrôle journalier est effectué durant lequel des examens cliniques seront effectués (points limites).

10490 La mesure en continu de la glycémie grâce à des capteurs (biosenseurs) implantés pour une longue durée (> 6 mois) est un challenge qui permettra d'améliorer considérablement la qualité de vie des patients diabétiques. Les électrodes miniaturisées et fonctionnalisées par recouvrement avec des molécules actives (enzymes) sont développées en collaboration avec des spécialistes de l'enzymologie, de l'électrochimie et de l'électronique. Après vérification dans le tube à essai de la fonctionnalité des électrodes, celles-ci seront implantées en position dorsale sous-cutanée sur des rongeurs. La première étape de ce projet concerne la protection des électrodes contre la réaction à corps étranger. Il est en effet essentiel que celle-ci soit aussi limitée que possible, à la fois pour préserver la fonctionnalité des enzymes, mais aussi pour prévenir la formation d'une capsule fibreuse qui isolerait l'électrode et ne lui permettrait plus de délivrer une mesure correcte. Pour cela, des hydrogels, par ailleurs testés dans une autre saisine déjà validée seront utilisés pour recouvrir les électrodes. Les électrodes seront alors laissées en place pour une durée variable (1 à 21 jours, puis un temps long (jusqu'à 6 mois)). Les études effectuées nécessiteront l'euthanasie des animaux pour procéder à des analyses histologiques aux différents temps.

3R. REMPLACEMENT. A l'issue des tests de fonctionnalité dans le tube à essai, le remplacement n'est pas possible puisque la biocompatibilité et le maintien de la fonctionnalité dans l'organisme

impliquent des réactions multiples et complexes de l'organisme, qui ne peuvent être reproduites in vitro. REDUCTION. Le nombre d'expérimentations sera réduit par les mesures suivantes : ne seront utilisés pour recouvrir les électrodes que des matériaux ayant montré une très faible activité d'induction de la fibrose. D'autre part, dans la mesure du possible, la fonctionnalité des électrodes sera suivie de manière longitudinale ; euthanasies et explantations ne seront donc nécessaires que pour les analyses histologiques à des temps courts et intermédiaires visant à caractériser la réaction à corps étranger induite au niveau de l'électrode. Enfin, le nombre d'animaux pour chaque test sera réduit par l'implantation d'électrodes indépendantes sur chaque côté lorsque les physiciens seront capables de réunir les deux capteurs (anode & cathode) sur la même électrode. RAFFINEMENT. La miniaturisation des électrodes (diamètre 250 microns, longueur 2 à 5 cm, à optimiser) leur assure une souplesse qui leur permet de se déformer lorsque l'animal bouge. Testées d'abord sur des rats qui ont l'avantage d'être plus grands, nous utiliserons ensuite des souris lorsqu'une miniaturisation des capteurs sera disponible. Si la durée de l'anesthésie est supérieure à 15 minutes, les animaux seront posés sur une surface chauffante. En se basant sur une saisine associée déjà validée (pour les tests d'implantation de matériaux en sous-cutané), il n'est pas prévu de traitement contre la douleur.

Le nombre total d'animaux pour ce projet s'élève à 650. La proportion souris/rats dépendra complètement de la possibilité - ou non - d'utiliser des souris ; si celles-ci s'avèrent trop petites pour l'implantation des capteurs et leur maintien pendant plusieurs mois, seuls des rats seront utilisés ; ce choix sera fait en fonction de l'évolution des expériences et de ce que les physiciens seront capables de miniaturiser. Le projet réunit l'activité de 4 équipes (contrat ANR 2016-2021) et 15 équipes (projet européen 2019-2023, financé) et sera, pour la partie expérimentation animale, sous la responsabilité d'un laboratoire spécialisé dans l'implantation de biomatériaux. Il se rattache à une saisine déjà validée car les hydrogels utilisés ici pour protéger les électrodes et diminuer la réaction à corps étranger ont été - ou seront - testés dans le cadre de cette saisine.

10491 Dans le cadre de la recherche et développement de médicaments vétérinaires destinés à être administrés à l'animal de rente, 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 (ou protocole cadre) est de définir les conditions de réalisation des études de pharmacocinétique chez le bovin 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, 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'animal est le bovin 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 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 pharmacocinétique chez le bovin 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 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 pour leur éviter toute souffrance ; les conditions d'hébergement permettent aux animaux de répondre à leurs besoins physiologiques,
- les points limites sont toute altération 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 examiner l'animal et prendra les décisions adéquates pour sa protection,
- la chronologie des études sera définie de manière à minimiser le nombre d'animaux à utiliser.

Ce projet couvre également le recueil de sang, d'urine ou de fèces dans le but de préparer des matrices témoins requis pour la validation des méthodes de dosage des échantillons générés dans ce projet.

10492 Le diabète de type 2 (DT2), caractérisé notamment par une résistance de l'organisme à l'insuline, est associé au développement de divers troubles du système nerveux central dont des troubles de la mémoire et du comportement émotionnel (anxiété, dépression).

L'objectif général du projet est de mieux comprendre les mécanismes neurobiologiques impliqués dans le développement des troubles de la mémoire et de la dépression fréquemment associé au DT2. Est-ce qu'une résistance à l'insuline dans des régions cérébrales clés de régulation de la mémoire et des émotions est impliqué dans les troubles neuropsychologiques associés au DT2?

Un moyen expérimental de générer une insulino-résistance localement est de bloquer l'expression du récepteur à l'insuline sélectivement dans une région cérébrale. Le récepteur à l'insuline est exprimé dans les neurones sérotonine (5-HT), qui ont largement été décrit dans la littérature comme étant impliqués dans l'étiologie des troubles neuropsychiatriques (anxiété, dépression, troubles psychotiques, etc...). Le but de ce projet est d'étudier les conséquences de la suppression du récepteur insuline dans les neurones sérotonine (croisement de deux lignées de souris transgéniques) sur l'activité électrique de ces neurones et, au niveau fonctionnel, sur le métabolisme énergétique et les comportements émotionnels et mnésiques. Ce projet permettra de déterminer si une résistance à l'insuline au niveau des neurones sérotonine participe au développement de troubles du comportement émotionnel et mnésique.

Ce projet de 4 ans sera réalisé sur 450 souris. L'étude de comportements anxio-dépressifs ou de la mémoire ne peut être réalisée que sur animaux vivants ce qui rend impossible le remplacement de ceux-ci par des modèles in vitro. Le nombre d'animaux sera réduit au mieux grâce à l'utilisation de tests statistiques montrant la différence entre plusieurs groupes. Des expériences ex vivo sur tranches de cerveau sont également prévues mais celles-ci ne seront réalisées que si les expériences in vivo de comportement sont concluantes. Toutes les précautions possibles seront prises afin de raffiner nos procédures et réduire au mieux l'inconfort des animaux (utilisation d'analgésiques local, hébergement en cages collectives, enrichissement de l'environnement et points limites précoces adaptés).

10493 Les pathologies cardio-vasculaires représentent les principales causes de morbidité et de mortalité chez le patient insuffisant rénal chronique. Environ 50% des décès chez ces patients sont dus à un événement cardiaque majeur, tels que le syndrome coronarien aigu, l'insuffisance cardiaque à fonction ventriculaire gauche préservée ou altérée, les arythmies et la mort subite. Les événements cardiovasculaires sont précédés par la modification de la fonction cardiaque et vasculaire.

L'hypertrophie du ventricule gauche représente l'élément majeur impliqué dans le syndrome cardio-rénal avec une augmentation de la fibrose (dépôt anormal de fibres de soutien). La fibrose mène à un défaut de contraction du cœur aboutissant à une insuffisance cardiaque. Ces atteintes (hypertrophie, fibrose et dysfonction cardiaque) apparaissent comme des facteurs prédictifs précoces et indépendants de survenue d'événements cardiovasculaires dans l'insuffisance rénale chronique.

Dans l'insuffisance rénale chronique, une perte de fonction et de masse musculaire est également observée. Environ 50% des patients IRC en dialyse sont affectés par une myopathie urémique. Cela se caractérise par une atrophie musculaire entraînant une faiblesse musculaire. Cette myopathie urémique est corrélée avec une augmentation de la mortalité et de la morbidité. De plus, 90% des

patients dialysés sont affectés par une neuropathie périphérique, également connues sous le nom de Neuropathie urémique. Les complications neurologiques les plus fréquentes sont des symptômes tels que la douleur, la perte de sensation et la faiblesse. Dans les cas avancés, les nerfs moteurs peuvent être affectés entraînant une faiblesse et une atrophie des muscles distaux. A ce jour, peu d'études se sont intéressées à la caractérisation de la dysfonction musculaire et neuromusculaire dans l'insuffisance rénale chronique ainsi qu'aux mécanismes moléculaires à l'origine de ces anomalies cliniques.

Notre projet a pour but d'étudier de manière intégrative les mécanismes de l'atteinte cardiaque, de comprendre son développement au niveau tissulaire et cellulaire ainsi que d'évaluer la valeur prédictive des biomarqueurs sanguins au cours de l'évolution de l'insuffisance rénale et du développement de l'atteinte cardiaque. L'atteinte des muscles squelettiques sera également évaluée à différents temps. Le modèle animal est indispensable à cette étude sur les effets cardiaques et musculaires d'une pathologie rénale. L'interaction entre différents organes (rein-coeur-muscles) est nécessaire et elle représente bien la pathologie humaine affectant divers organes cibles. Ainsi, nous ne pouvons envisager de modèle in vitro type cellules, organes ou organoïdes.

Cette étude sera réalisée sur un total de soixante-dix (70) rats. Pour les rats témoins, 30 rats seront utilisés, 10 à chaque temps, pour les mesures de fonction cardiaque (échocardiographie), de morphologie cardiaque et les prélèvements d'organes (euthanasie). En revanche, pour les rats développant spontanément une insuffisance rénale progressive liée à la présence de kystes au niveau rénal et hépatique, 20 rats sont nécessaires à chaque temps pour pallier la variabilité des paramètres d'intérêt. Ceci nécessiterait donc l'utilisation de 60 rats soit 90 au total. Pour réduire le nombre d'animaux, 10 rats seront euthanasiés (échographie et prélèvements) à chaque temps (n=30) et 10 autres seront suivis en échocardiographie à l'âge de 3, 6 et 9 mois mais ne seront euthanasiés qu'au dernier temps. Tout en gardant un nombre de rat ayant une échocardiographie égal à 20 à chaque temps, le suivi échocardiographique de 10 animaux permet une réduction du nombre de 20, et ramène le total de rats utilisés à 70. Tout au long de l'étude, un suivi hebdomadaire de l'évaluation pondérale avec une vérification de l'état général est réalisé selon une grille de score adaptée (points limites).

10494 L'étude décrite dans le présent dossier sera réalisée dans le cadre d'une prestation contractuelle pour le compte d'un client qui développe des fibres alimentaires visant à améliorer ou prévenir les troubles métaboliques (obésité, surpoids), en agissant sur les mécanismes de satiété et sur le métabolisme énergétique dans son ensemble. Le principal objectif est donc d'étudier l'impact de 4 fibres en développement sur le poids corporel, la composition corporelle (%ages d'eau, de tissu maigre, de tissu gras), la prise alimentaire, les dépenses énergétiques et la vidange gastrique chez la souris sauvage.

L'étude se découpe en deux phases successives :

- Une phase de 7 jours d'acclimatation à l'animalerie après réception des animaux (D-7-D-1)
- Une phase de 21 jours de traitement avec l'une des 4 fibres à tester (fibres mélangées à la nourriture; T1-T21).

Juste avant (D-1) et vers la fin du traitement (T18), une mesure de composition corporelle sera réalisée sur animal vigile à l'aide d'un minispec LF90II (BRUKER). Par ailleurs, à T1-2 et T19-T20, les animaux seront placés dans un système de cages intelligentes (Physiocages, HARVARD APPARATUS) couplées à de la calorimétrie indirecte (Oxylet, HARVARD APPARATUS) permettant de réaliser pendant 48h des mesures automatisées et à haute résolution de la prise alimentaire, de la prise hydrique, des échanges respiratoires (permettant de calculer les dépenses énergétiques) et de l'activité locomotrice.

Enfin, à l'issue du protocole (T21), une mesure de la vidange gastrique sera effectuée avant euthanasie et des prélèvements tissulaires terminaux.

L'étude nécessitera l'emploi de 46 souris réparties en 5 groupes expérimentaux en fonction des traitements présents dans la nourriture :

- Groupe 1 : Nourriture non supplémentée (Groupe contrôle; n=14)
- Groupe 2 : Nourriture supplémentée avec la fibre 1 (n=8)

- Groupe 3 : Nourriture supplémentée avec la fibre 2 (n=8)
- Groupe 4 : Nourriture supplémentée avec la fibre 3 (n=8)
- Groupe 5 : Nourriture supplémentée avec la fibre 4 (n=8)

La règle des 3Rs a été prise en compte dans l'élaboration du présent protocole :

- Raffinement : Le modèle animal envisagé est un modèle souris C57Bl/6 qui est particulièrement bien documenté dans la littérature pour ce type d'étude. Le choix du modèle a été validé avec le client. Le protocole a été planifié de façon à limiter au maximum tout stress et tout inconfort pour les animaux. Un enrichissement des cages d'hébergement sera assuré par l'ajout de maisons dôme. Enfin, bien que le protocole ne soit pas invasif, un suivi journalier des animaux permettra une action rapide en cas d'atteinte des points limites établis.
- Réduction : Le nombre d'animaux utilisés par groupe a été calculé au minimum de façon à pouvoir 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, à ce jour, aucune méthode de substitution n'utilisant pas l'animal de laboratoire et permettant l'étude de l'impact d'un traitement sur la satiété et le métabolisme énergétique.

10495 Dans le cadre de la recherche et développement de médicaments vétérinaires destinés à être administrés au chien, 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 (ou protocole cadre) est de définir les conditions de réalisation des études de pharmacocinétique chez le chien dans le respect du bien-être animal et de la règle des 3Rs, pour pouvoir établir le profil pharmacocinétique du produit en développement et évaluer sa biodisponibilité. 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 chien, 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 (évaluation de la biodisponibilité ou du profil pharmacocinétique du produit, bioéquivalence) 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 pharmacocinétique chez le chien 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,

- 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,

- les points limites entre autres sont toute altération du comportement propre à l'espèce ou de l'aspect de l'animal, perte d'appétit dans les jours suivant la pharmacocinétique, 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, d'urine ou de fèces dans le but de préparer des matrices témoins requises pour la validation des méthodes de dosage des échantillons générés dans ce projet.

10496 Le réseau vasculaire du système nerveux central (SNC) permet des échanges constants entre le compartiment sanguin et le parenchyme nerveux. Ce système vasculaire permet des échanges finement régulés et est très sélectif d'où son nom de barrière hémato-encéphalique (BHE). Son rôle est d'assurer l'apport d'éléments essentiels au bon fonctionnement du cerveau (glucose, lipides, acides gras, vitamines, protéines), mais aussi sa protection. Cette barrière bloque à la fois, les agressions pathogènes et toxiques provoquées par les bactéries, virus ou micro-organismes, ainsi que le passage de molécules non-spécifiques tels que certains médicaments.

A l'heure où les pathologies du SNC sont la première cause mondiale de handicap et constituent avec le vieillissement de la population des enjeux majeurs de santé publique, la connaissance des mécanismes et des acteurs de cette barrière est devenue un réel challenge pour la communauté scientifique. En effet, de nombreux traitements sont développés pour traiter les neuropathies, mais beaucoup d'entre eux sont abandonnés, notamment en raison d'un passage insuffisant à travers la BHE. Plusieurs stratégies sont en cours d'exploration pour faciliter le passage de molécules et surtout de biomolécules à travers la BHE. Parmi ces stratégies, on trouve le développement de molécules-vecteurs qui améliorent la biodisponibilité et le passage d'agents thérapeutiques à travers la BHE. Ainsi, grâce à la reconnaissance spécifique d'un partenaire ou d'un récepteur, le complexe vecteur-médicament pourra franchir cette barrière et agir dans le parenchyme nerveux. Dans le cadre du développement de telles technologies, notre société et son partenaire académique se sont regroupés au sein d'un Laboratoire Commun de Recherche (LCR), avec le soutien de laboratoires académiques pour le développement de peptides vecteurs conjugués à des molécules thérapeutiques (pVectors). Ces molécules sont destinées aux traitements de lésions post-traumatiques ou de pathologies du SNC comme la maladie d'Alzheimer. Certains de ces peptides conjugués à des agents thérapeutiques sont développés dans le cadre de partenariats avec d'autres partenaires académiques ou industriels.

Dans la continuité de nos recherches et afin de développer les phases précliniques de nos candidats médicaments, nous envisageons de réaliser des expériences sur le petit animal de laboratoire (rongeurs). C'est pourquoi, nous réalisons une demande d'autorisation à l'expérimentation.

Ce projet se déclinera en 3 procédures et pour une durée de 5 ans :

Procédure 1 : Développer des pVectors stables, hautement spécifiques de la BHE et sans effets secondaires pour les animaux.

Nos pVectors conjugués préalablement criblés, sélectionnés et produits (tests vitro internes et collaborations) sont testés de manière à valider leur stabilité plasmatique et l'absence d'effets secondaires chez le rongeur.

Pour cette partie, nous envisageons d'utiliser un nombre maximum de 75 souris par an. Ce nombre est calculé sur la base de :

-15 animaux par conjugué, correspondant au nombre minimum et nécessaire pour pouvoir tester un pVector de façon fiable et robuste.

-5 conjugués par an, correspondant au nombre maximal de candidats retenus après avoir été développés et produits pour être testés.

Procédure 2 : Evaluer le potentiel de ciblage de nos candidats en biodistribution (pharmacocinétique) et plus particulièrement l'adressage au cerveau.

Seuls et uniquement les conjugués validés en procédure 1 (c.à.d. bonne stabilité et sans effets secondaires) seront testés afin de mesurer leur temps de demi-vie in vivo et leur répartition dans l'organisme.

Dans cette procédure, chacun des conjugués sera testé en parallèle de son contrôle négatif sur deux lignées de souris (une lignée d'intérêt vs son contrôle) et ce, sur des cinétiques incluant 5 temps. Chaque groupe ou lot test sera composé de 4 souris, soit un total de 80 souris par candidat. Au final, à raison de 5 études par an et un nombre de 400 souris, cela représente 2000 animaux sur 5 ans.

Procédure 3 : Mesurer l'effet de ces mêmes vecteurs-médicaments sur des modèles pathologiques spontanés.

En cas de concentration au niveau de l'organe d'intérêt (validation procédure 2), ici le cerveau, les mêmes tests seront réalisés sur des souris développant la pathologie cible (Alzheimer).

De cette manière, pour chaque étude qui atteint la procédure 3, le candidat et son contrôle seront testés à différentes doses de traitement (3 doses), sur des animaux Alzheimer présentant deux stades évolutifs de la maladie (précoces et tardifs) et animaux sains.

Au total, nous aurons besoin de 18 lots de 3 animaux (54 souris). Si l'on considère que l'ensemble des études (5/an) sont des succès, nous arrivons à un total maximal de 270 animaux/an pour cette 3ème procédure.

Pour cette étude globale (3 procédures) d'une durée de 5 ans, nous envisageons donc d'utiliser au maximum : 375 animaux pour la procédure 1, 2000 pour la procédure 2 et 1350 pour la procédure 3, soit un total de 3725 animaux.

Au cours de ces 3 procédures, le bien-être animal sera un critère essentiel, que ce soit pour les animaux ou pour la qualité des expérimentations, et ce, en amont comme en post-expérimental. Pour cela, en plus du suivi quasi quotidien du responsable de projet, l'enrichissement, le change et le suivi seront assurés par les animaliers (selon le guide des bonnes pratiques animalerie). Dans le cadre de souris non issues des élevages internes, les animaux seront réceptionnés une semaine minimum avant expérimentation.

Point par point, la société et ses collaborateurs (partenaires académiques et industriels) contrôleront le bénéfice/risque pour valider ou non le passage à l'étape suivante (cf. ci-dessus). Cette validation est indispensable avant d'envisager des tests d'efficacité sur les modèles rongeurs sains ou pathologiques (stratégie « Go /No go »).

10497 Les microhémorragies cérébrales sont caractérisées par une rupture des petits vaisseaux intracérébraux, conduisant à des épanchements sanguins d'un diamètre inférieur à 5 mm chez l'Homme, et considérés sans gravité. Elles sont cependant observées en nombre plus ou moins grand dans les cerveaux de patients décédés de la maladie d'Alzheimer, ou dans celui des patients survivants atteints d'angiopathie amyloïde. Leur toxicité pour le tissu cérébral est souvent spéculée mais n'a jamais été démontrée, laissant planer le doute à propos de leur impact potentiel sur l'apparition ou l'évolution d'un déclin cognitif. Seuls deux travaux ont montré que les microhémorragies cérébrales ne détériorent pas mécaniquement la structure des dendrites des neurones adjacents, et que le plasma sanguin fuit lors de la rupture ou de l'occlusion d'un microvaisseau. Plus surprenant encore, les mécanismes hémostatiques cérébraux menant aux microhémorragies n'ont jamais été étudiés. Quelques études ont mis en avant la particularité de la régulation de l'hémostase par le cerveau, mettant en évidence une toxicité de la thrombine (facteur terminal de la coagulation) dans le parenchyme cérébral, ainsi que l'impact du fibrinogène et de ses produits de dégradation sur les mécanismes neurodégénératifs. Si les microhémorragies libéraient ces deux acteurs de la coagulation, et si ces derniers endommageaient le parenchyme cérébral, ces deux questions n'en demeurent pas moins difficiles à traiter en préclinique. En effet, les quelques études dans lesquelles on observe des hémorragies cérébrales sont menées soit sur des animaux transgéniques où des microlésions apparaissent spontanément dans un contexte tissulaire déjà altéré, soit sur des animaux soumis à des injections de substances biochimiquement toxiques qui induisent des hémorragies trop volumineuses pour être comparables aux microhémorragies humaines et pour permettre un suivi de l'animal au long terme. Le but de ce projet est de rechercher la présence de substances sanguines dans le parenchyme de cerveaux de souris soumises à des microhémorragies disséminées et d'évaluer leur neurotoxicité, puis d'estimer l'altération de l'hémostase locale, en examinant l'expression des régulateurs de la coagulation et de la fibrinolyse au niveau des microvaisseaux cérébraux. Enfin, ces paramètres seront modulés à l'aide d'un traitement pharmacologique (nouveaux anticoagulants directs oraux, AOD), ou d'un facteur de risque vasculaire (régime riche en graisse). Il s'agit de l'étude d'un modèle physiopathologique faisant appel à de nombreux types cellulaires et à de nombreux paramètres, dans l'interaction avec son environnement, donc la complexité et la cinétique ne peuvent être reproduites in vitro. 200 souris C57Bl6 seront nécessaires pour réaliser ce projet afin de valider un modèle de microhémorragies cérébrales disséminées, d'étudier les perturbations physiologiques engendrées et la neurotoxicité induite, et d'en moduler les effets induits. Cette étude étant une étude pilote utilisant un modèle animal innovant, une attention particulière et quotidienne sera effectuée auprès des animaux afin de surveiller l'apparition éventuelle de souffrance ou de points limites pour

lesquels des décisions adaptées seront prises (réhydratation, réchauffement, euthanasie si nécessaire).

10498 Contexte : Le traitement de l'ostéoporose, de plus en plus fréquente dans nos populations, représente un enjeu majeur de santé publique. Cette perte osseuse résulte d'un déséquilibre entre la formation et la résorption osseuses qui entraîne une fragilisation de l'os et augmente le risque fracturaire chez des personnes qui ont de faibles capacités de réparation osseuse. Cette ostéoporose survient dans différentes circonstances. Les mieux étudiées sont liées au vieillissement, à la ménopause, aux traitements par des corticoïdes. L'anorexie mentale, qui touche principalement les adolescentes et les jeunes femmes, est un autre contexte pathologique induisant également une ostéoporose. Cette ostéoporose quasiment irréversible entraîne un risque fracturaire tout au long de la vie multiplié par 7 pour les personnes ayant souffert d'anorexie à un moment de leur vie. Chez les patientes anorexiques, la comparaison de différentes études suggère que le degré d'ostéoporose serait notamment fonction de la sévérité de la perte de poids et de la durée de l'aménorrhée (interruption des cycles menstruels). Étonnamment dans l'anorexie mentale, comme dans les autres contextes induisant une ostéoporose, quelques rares études des caractéristiques de la moelle osseuse indiquent que selon le degré de sévérité il y aurait une augmentation du nombre voire de la taille des adipocytes dans la moelle osseuse.

Objectif de l'étude : Notre hypothèse de travail est que les adipocytes de la moelle osseuse seraient impliqués dans le déséquilibre entre formation et résorption osseuse. En effet d'une part, ils ont les mêmes cellules progénitrices que les ostéoblastes qui contribuent largement à la formation osseuse, et donc le développement d'adipocytes se ferait au détriment de celui des ostéoblastes, entraînant une diminution de la formation osseuse. D'autre part, les adipocytes de la moelle osseuse seraient capables de sécréter, dans cet environnement confiné, des facteurs bloquant l'activité de formation osseuse des ostéoblastes. L'objectif principal de la présente étude est de mettre en évidence les relations entre la sévérité de la perte de poids, les altérations du métabolisme énergétique, l'adiposité de la moelle osseuse et la perte de masse osseuse dans un modèle murin mimant les conséquences de l'anorexie mentale. Cette étude comprend également une phase de récupération destinée à mimer le processus de guérison, afin de déterminer parmi les altérations observées dans la phase précédente, celles qui sont corrigées et celles qui ne le sont pas et qui pourraient constituer un frein au long et incertain processus de rétablissement. Ces informations pourront par la suite constituer des pistes de réflexions pour la conception de nouvelles stratégies thérapeutiques et la désignation de nouvelles cibles de traitement.

Modèles animaux et méthodologie : le modèle animal déjà utilisé dans de précédentes études est appliqué sur des souris femelles de 8 semaines d'âge, ce qui permet de se placer dans des conditions les plus proches possibles de celles liées à la pathologie humaine. Ce protocole d'induction associe un stress chronique modéré (la séparation des animaux) qui est un facteur clé de la pathologie humaine et une réduction progressive du temps d'accès à l'alimentation (qui empêche une suralimentation compensatoire). Le choix de la durée d'accès à l'alimentation détermine la sévérité du protocole, évaluée par le calcul du pourcentage de perte de poids par rapport au jour précédent le début du protocole. L'étude sera réalisée sur 4 cohortes au total. Deux cohortes suivront uniquement le protocole d'induction pendant 10 semaines (durée qui permet l'observation de répercussions osseuses) et deux autres suivront le protocole d'induction pendant 10 semaines puis le protocole de récupération pendant 10 autres semaines (remise en conditions classiques d'élevage). Chaque cohorte sera constituée de 8 souris contrôles (conditions classiques d'élevage), 8 souris avec poids stabilisé et 8 + 8 souris avec deux niveaux de perte de poids différents. L'effectif de 10 souris pour le groupe correspondant aux conditions les plus sévères, permet de garantir un nombre minimal de 8 animaux en fin d'étude pour permettre l'exploitation statistique des données. Notre expérience nous a permis de déterminer que lors de l'acquisition de chaque cohorte, 2 souris supplémentaires étaient nécessaires, afin de pouvoir écarter de l'étude des individus présentant un poids initial trop différent de celui de l'ensemble de la cohorte. Le nombre d'animaux prévu pour chaque groupe est déterminé sur la base de nos études précédentes sur ce modèle. Au total 144 animaux seront donc utilisés pour cette étude. A la fin de l'étude les souris seront euthanasiées pour permettre les différents prélèvements tissulaires et sanguins qui

seront ensuite analysés (niveaux d'expression génique des principaux marqueurs métaboliques et de différenciation, dosages de facteurs hormonaux circulants, étude la microarchitecture osseuse, de l'adiposité médullaire osseuse et étude in vitro des capacités de différenciation des cellules stromales de la moelle osseuse).

Remplacement, réduction et raffinement : L'objectif du projet étant d'étudier des phénomènes intimement liés à la physiologie, aux balances hormonales et aux boucles de régulation en réponse à la perte de poids corporel, il n'est pas possible de remplacer l'expérimentation animale par une autre approche pour répondre aux questions posées. Le nombre d'animaux a été réduit au minimum nécessaire en combinant de nombreuses analyses à partir des prélèvements effectués sur les mêmes animaux, y compris une étude mécanistique in vitro à partir des cellules de la moelle osseuse. Le bien-être des animaux a été pris en compte tout au long de la conception de cette étude. Chaque animal est pesé et observé quotidiennement afin de déterminer s'il n'est pas dans une situation critique se manifestant par une prostration, des tremblements, des difficultés à s'alimenter. Si c'est le cas l'animal reçoit un supplément d'alimentation et après 48h, si son état ne s'est pas amélioré il est retiré de l'étude et euthanasié. Notre expérience de ces protocoles nous permet de réduire les risques d'arriver à cette situation en intervenant précocement.

10499 Le cancer de l'ovaire (de haut grade) est la cinquième cause la plus fréquente de décès par cancer chez les femmes. Il n'existe pas à l'heure actuelle de traitement thérapeutique efficace dans le cas cancer de l'ovaire de haut grade, initialement sensible au carboplatine et qui récidive. La survie à 5 ans pour les cancers de l'ovaire de haut grade n'a pratiquement pas évolué dans les deux dernières décennies (environ 25 %) démontrant un besoin de nouveaux traitements. Ce projet vise à une validation préclinique de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Le traitement standard consiste à éliminer la tumeur par chirurgie puis un traitement avec du carboplatine. 80 % des patientes présente une bonne réponse au traitement, mais des repousses tumorales sont observées après plusieurs mois (12-24 mois).

Nous avons développé des modèles animaux en greffant des tumeurs humaines de cancer de l'ovaire sur des souris (39 modèles au total). Ces modèles permettent d'évaluer des traitements avec pour objectif de développer de nouvelles chimiothérapies pour la clinique humaine.

Nous avons traité plusieurs tumeurs humaines poussant sur la souris avec des traitements similaires à ceux utilisées chez les patientes souffrant de cancer de l'ovaire. Nous avons pu constater des réponses analogues à celle des patientes. Ces modèles sont de très bons modèles pour étudier et proposer des traitements contre la récurrence. Nous avons observé que, dans les cas de récurrence, se produit une réaction de fibrose qui entoure la tumeur d'une gangue fibreuse. Nous émettons l'hypothèse que cette gangue fibreuse pourrait empêcher la pénétration du carboplatine dans la tumeur, protégeant ainsi certaines cellules tumorales de l'effet du carboplatine.

Objectif du Projet :

Dans ce projet, nous comparerons des traitements au carboplatine seul avec un traitement au carboplatine + un inhibiteur de la fibrose (médicament utilisé actuellement pour d'autres pathologies mais pas en cancérologie) et nous constaterons son effet sur la récurrence tumorale. Nous testerons ces traitements sur des souris porteuses de tumeurs prélevées chez des patientes atteintes de cancer de l'ovaire. Notre objectif est d'identifier un traitement évitant les récurrences pour les cancers de l'ovaire de haut grade pour tenter d'améliorer la survie des patientes.

Le plan expérimental a été conçu en prenant en compte la règle des 3R :

- le nombre d'animaux a été réduit à la quantité nécessaire pour une exploitation statistique pertinente des données

- Nous avons optimisé (raffiné) l'expérimentation : - le protocole est établi en fonction des données publiées sur le modèle tumoral et des expériences sur des cultures de cellules. Des points limites ont été établis dans la procédure expérimentale pour réduire la souffrance animale ; une attention particulière sera apportée au bien-être animal : les animaux seront surveillés quotidiennement, l'hébergement sera modifié par enrichissement du milieu et le nombre d'animaux par cage sera limité.

-Nous avons envisagé de remplacer ces expériences sur des animaux par des expériences sur in vitro. Cela n'est pas possible pour deux raisons : la fibrose est une réaction entre la tumeur et le

tissu normal environnant et ne peut être observée que dans un modèle animal. De plus, de nombreuses publications montrent clairement que le modèle animal que nous utilisons est celui qui permet de mieux prédire l'efficacité d'un traitement anticancéreux chez les patients humains. Cette étude nécessite l'utilisation de 252 souris immunodéficientes sur une durée de cinq ans.

10500 Les composants de la matrice extracellulaire jouent un rôle central dans la biologie du tissu osseux, et en particulier les protéines de la famille des SIBLING (Small Integrin-Binding Ligand, N-linked Glycoproteins).

Des souris présentant une extinction génique (simple ou double KO) de deux SIBLING majeures, l'ostéopontine (OPN) et la sialoprotéine osseuse (BSP), ont été générées dans le but d'évaluer l'effet de leur absence sur le squelette, et en particulier sa minéralisation, dont les protéines SIBLING sont de puissants régulateurs.

Notre objectif est de découvrir comment l'absence de l'OPN, de la BSP ou des deux protéines (dont certaines fonctions sont complémentaires) va altérer le métabolisme phosphocalcique des souris (régulation de l'ingestion et de l'excrétion du calcium et du phosphate).

Pour ce faire, nous placerons des souris mâles et femelles, sauvages et mutantes (3 lignées mutantes), âgées de 2 et 4 mois, dans des cages métaboliques pour une durée de 24 heures.

Entre une et trois souris seront placées par cage, et urines et fèces seront collectés à la fin de leur séjour.

L'enrichissement ou l'appauvrissement du régime alimentaire en calcium et/ou phosphate, ainsi que l'injection d'OPN permettront de mesurer la réponse des souris mutantes à ces conditions, et donc le rôle joué par BSP et OPN dans ces mécanismes.

Ce travail ne peut être réalisé que sur des organismes complets génétiquement modifiés, donc sur des souris.

Le projet utilisera un maximum de 700 souris, réparties dans 42 groupes à 15 souris/génotype, en rajoutant 70 souris supplémentaires pour des répétitions éventuelles, des essais en souris isolée.

Chaque animal bénéficiera d'une attention et de soins de qualité, par du personnel qualifié, pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude (points limites).

En dehors du temps expérimental, les animaux seront hébergés en groupes harmonieux (par 4), dans un environnement enrichi (copeaux, bâtonnets à ronger), l'eau et la nourriture sont mises à disposition « ad libitum » et de la musique sera diffusée en salle d'hébergement pour diminuer le stress et atténuer les bruits environnementaux.

10501 L'équipe a un intérêt de longue date dans la compréhension des mécanismes moléculaires contrôlant le développement du système nerveux en utilisant l'embryon de poisson zèbre comme modèle. Nous utilisons un ensemble complémentaire de stratégies génétiques, moléculaires et d'imagerie pour notamment comprendre comment les facteurs de transcription proneuraux coordonnent la neurogenèse et la morphogenèse de la placode olfactive en développement, comment les cascades de signalisation intercellulaire interagissent pour spécifier différents sous-types de neurones dans la glande pinéale, et comment les asymétries gauche/droite sont mise en place dans le cerveau. Le poisson zèbre est un modèle reconnu et validé pour l'étude du développement embryonnaire. Il est notamment un modèle permettant la génétique, c'est-à-dire la génération de lignées transgéniques ou mutantes stables. Grâce à cela, les analyses sur les effets de pertes et de gains de fonctions des activités géniques sont possibles. De plus, l'embryon étant transparent, le poisson zèbre est un modèle de choix pour les analyses du développement dite « in vivo » par imagerie à haute résolution. Nos recherches fondamentales visent à étudier les mécanismes impliqués dans le développement embryonnaire en particulier lors de la mise en place du système nerveux central et de fait, se réalisent sur des embryons âgés de moins de 5 jours. Nous portons une attention particulière à la réduction du nombre de poissons hébergés au laboratoire ainsi que des embryons utilisés pour l'expérimentation et veillons donc à faire évoluer nos techniques expérimentales en conséquence. Ainsi, nous prévoyons de générer et d'utiliser 798 animaux pour ce projet. Les poissons adultes sont conservés à des fins purement reproductives. Bien que n'utilisant pas de protocoles invasifs, nous nous appliquons à réduire la souffrance, la

douleur et l'angoisse des poissons au maximum et veillons au bien-être de nos animaux en suivant quotidiennement les signes visibles d'un animal souffrant et en procédant si nécessaire à une euthanasie.

10502 Il y a 15 ans seulement, les synapses, qui interviennent dans le transfert de l'information dans le cerveau, étaient pensées comme des petites structures composées d'éléments stables. Notre groupe a démontré que les récepteurs de neurotransmetteurs ne sont pas stables, mais diffusent en permanence à la surface des neurones. Cependant, la fonction de ce mouvement reste encore incomprise. D'autre part, alors qu'on pense que la potentialisation de la transmission synaptique sous-tend la formation de la mémoire, son mécanisme moléculaire précis est encore inconnu. Ce projet vise à étudier l'importance physiologique chez l'animal dans son entier de la diffusion latérale des récepteurs AMPA au niveau de la membrane des neurones observés « in vitro ». Nous ciblons l'hippocampe dorsal comme structure d'intérêt car cette partie du système nerveux est importante dans la formation de la mémoire et pour le codage de l'information spatiale, et est donc au centre de notre capacité à percevoir, analyser et reconnaître notre environnement. Nous allons donc vérifier que l'immobilisation des récepteurs AMPA par « cross-link » par un anticorps spécifique anti GluA2 capable de modifier la plasticité synaptique, observée in vitro, est reproductible in vivo en injectant cet anticorps dans l'hippocampe et en mesurant les courants post-synaptiques dans cette structure et en soumettant l'animal à un test de mémoire pour mesurer d'éventuelles perturbations. Les animaux subissent une chirurgie peu douloureuse. Une fois leur récupération complète, ils sont soumis à un apprentissage spatial sous privation alimentaire légère avec injection intracérébrale d'agents pharmacologiques.

Justification du respect de la règle des 3R.

Remplacer : ce protocole nécessite l'utilisation d'animaux. En effet, l'étude de l'effet de l'immobilisation des récepteurs AMPA au cours de l'apprentissage spatial nécessite l'utilisation d'un cerveau intact chez l'animal vigile. Des méthodes in vivo telles que la culture cellulaire ou bien les coupes de cerveau ne permettent pas l'observation d'un apprentissage. Il n'existe donc pas de méthodes alternatives.

Réduire : le nombre d'animaux a été calculé par l'estimation de la variance observée avec ce type de données permettant d'atteindre une signification statistique. Ce nombre est donc de 15 souris par groupe, soit un total de 285 souris pour la réalisation de ce protocole.

Raffiner : afin de réduire au minimum la souffrance des animaux, les procédures suivantes seront utilisées :

A leur arrivée, les animaux sont mis en cage par l'animalier qui effectue un premier contrôle de leur état de santé. Les animaux bénéficient d'une période d'acclimatation, dans des cages collectives et bénéficient d'un enrichissement constitué d'un nid végétal. Ces cages offrent aux animaux un espace important pour se redresser. A la suite de cette période d'acclimatation, les animaux sont placés en cages individuelles. Les souris sont habituées à la manipulation ; elles ne sont donc pas stressées en présence de l'homme et lors des manipulations. Les animaux sont isolés pour une durée maximale d'un mois.

Les chirurgies sont réalisées sous anesthésie générale. Un traitement antalgique est systématique ; il est administré avant et trois jours suivant les actes chirurgicaux pour prévenir toute douleur. L'hébergement individuel des animaux est limité au maximum, et leur environnement est enrichi.

Pour limiter les dommages et contraintes subis par l'animal, nous avons définis des critères d'observation qui permettent d'évaluer l'état de santé et le bien-être des souris. Si les points limites que nous avons fixés sont franchis, l'expérience est immédiatement interrompue et l'animal concerné est euthanasié.

Cette évaluation est réalisée quotidiennement à partir du moment où l'animal est isolé en cage individuelle et rentre dans la phase expérimentale. Ces mesures ont lieu lors de la manipulation journalière des animaux. Les mesures sont consignées dans un cahier d'expérience prévu à cet effet.

10503 Les reins jouent un rôle important dans le corps humain ; ils sont principalement responsables de la filtration de sang et de l'élimination des toxines qui y circulent. Une fois dans les reins, le sang

passer à travers les néphrons où les déchets et l'excès d'eau sont évacués. Le sang purifié retourne dans le corps par les veines rénales. Les déchets filtrés du sang sont ensuite concentrés pour former l'urine. L'urine est recueillie par les bassinets avant d'être acheminée vers la vessie à travers les uretères où elle est emmagasinée. L'urine est ensuite évacuée du corps par l'urètre. Les reins agissent également comme glandes endocrines en produisant des hormones. La transplantation rénale, ou greffe de rein est une intervention chirurgicale consistant à remplacer un rein défectueux par un rein sain, prélevé sur un donneur. Selon la pathologie initiale, le greffon peut être posé sans que le rein ou les reins malades n'aient été retirés. Il s'agit de la greffe la plus courante, elle possède un taux de réussite élevé. Elle est pratiquée chez les patients souffrant d'insuffisance rénale terminale afin d'améliorer leur qualité de vie, et de les libérer des contraintes des séances de dialyses. Cette greffe n'est donc pas vitale pour le patient. La transplantation implique d'avoir à sa disposition un greffon qui peut être sur un donneur vivant ou sur un donneur décédé. La littérature rapporte également que les résultats de la survie chez les greffés à partir des donneurs vivants sont significativement meilleurs que les résultats obtenus à partir des donneurs décédés. La survie moyenne à dix ans est de 68 %, mais elle atteint 80 % chez les patients ayant un greffon à partir d'un donneur vivant.

De nombreux éléments montrent que la conservation des reins est capitale pour une meilleure intégration du greffon. Il existe des systèmes d'études précliniques de perfusion de greffons rénaux ex vivo qui permettent d'évaluer les conditions de conservation optimale du greffon pour optimiser la transplantation. Ce modèle existe pour le rongeur et l'étude de la fonction rénale, avec l'aide de cette machine qui perfuse les reins avec un liquide extracellulaire optimisé, permet également de tester leur viabilité d'une manière fiable.

Dans ce présent projet, en tant que prestataire de services pour différents laboratoires pharmaceutiques développant des médicaments candidats ou dans le cadre de ce projet, développant des milieux de conditionnement pour greffons, nous sommes responsables de la partie « dissection et prélèvement du système rénal » et une fois le système rénal prélevé sur la rat anesthésié, notre laboratoire partenaire se charge d'étudier le rein à l'aide d'un système de perfusion ex vivo pour tester différentes conditions de perfusion du greffon dans le but d'optimiser les chances de la transplantation. Ce système ex vivo est un modèle préclinique venant après la sélection de candidats médicament sur des modèles de culture in vitro. Il représente un bon compromis pour les tests d'efficacité réduisant ainsi le nombre d'animaux utilisés pour ce projet et leur souffrance car chaque rein prélevé sur un rat anesthésié permet de tester une condition expérimentale versus l'autre rein.

Ce projet est estimé sur 2 ans et une moyenne de $n=100$ rats par an a été évalué, à raison de 1 à 2 paires de reins livrées par semaine, soit un nombre total de $n=200$ prélèvement de reins à partir de rats anesthésiés. Les prélèvements de reins se réalisent sous anesthésie par gaz halogéné (isoflurane) avec un antalgique adapté qui représente un raffinement car elle est mieux tolérée par l'animal. Le rat est également intubé et sa respiration est ainsi assistée empêchant toute dépression respiratoire au cours de l'anesthésie. Un suivi de paramètres physiologiques est réalisé par la pose d'un oxymètre de pouls mesurant le taux d'oxygène artériel ainsi que la fréquence cardiaque tout au long de la chirurgie permettant un raffinement des conditions de chirurgie et de bien-être pour l'animal. L'animal ne sera pas réveillé à la fin de la chirurgie. Ce protocole est ainsi classé sans réveil.

10504 Ces dernières années, l'amélioration des techniques d'analyse du microbiote intestinal a permis de mettre en évidence une association entre des déséquilibres du microbiote intestinal (dysbiose) et de multiples pathologies humaines. Bien que variables d'une maladie à l'autre, la diminution de la diversité du microbiote (DDM) est constante et commune à une grande diversité de pathologies dysimmunitaires, métaboliques voire même neuropsychiatriques ou cancéreuses.

Dans plusieurs modèles macro-écologiques, la perte de diversité est associée à la perte des grands prédateurs. Nous postulons que, par analogie, la perte de prédateurs bactériens dans notre système écologique microbien intestinal peut entraîner une perte de diversité.

Dans un premier temps, il sera question de tester la preuve de concept chez la souris que les prédateurs permettent de prévenir et/ou de corriger une dysbiose avec DDM et l'obésité

nutritionnelle. En fonction des premiers résultats, d'autres modèles animaux de maladies associées à des dysbioses avec DDM seront étudiés et nécessiteront une seconde demande d'autorisation de projet.

Le projet, d'une durée de 1 an, implique l'utilisation de souris C57BL6. Les mécanismes étudiés reposent sur des interactions complexes non reproductibles par la culture d'organes séparés, impliquant de recourir à l'animal. De plus notre projet repose sur l'étude du microbiote intestinal dont la majorité des espèces ne peut pas être cultivée hors de l'organisme lui-même.

Toute la démarche scientifique a été établie afin de respecter la règle des 3R (Réduire, Raffiner, Remplacer). Toutes les expérimentations réalisées utiliseront le nombre d'animaux minimum de façon à tirer des conclusions statistiquement fiables. Un effectif de 10 souris par groupe a été estimé nécessaire pour la réalisation du projet. Ce projet nécessitera l'utilisation de 88 souris. Le raffinement des expériences est assuré par la mise en place de points limites pour éviter l'inconfort et la douleur des souris. Le remplacement n'est pas possible dans cette phase préliminaire.

Toutes les dispositions visant à prévenir le stress et la douleur seront prises en compte. Les tests statistiques seront non paramétriques de type Wilcoxon (comparaison de deux groupes), ou Kruskal-Wallis (comparaison de plus de deux groupes). Les analyses du microbiote seront faites avec la plateforme FROGS.

10505 L'olfaction est un sens souvent négligé qui, aujourd'hui, fait l'objet de nombreuses études. Les odeurs influencent nos actions, par exemple en stimulant notre appétit, nous prévenant de dangers ou encore nous entraînant à faire des achats dans les magasins. Egalement, l'olfaction est une des premières fonctions touchées par les maladies neurologiques et neuropsychiatriques telles qu'Alzheimer, la dépression ou l'obésité. Il a récemment été montré que le principe actif du cannabis ou encore les molécules similaires produites par notre corps, les endocannabinoïdes (ECs), sont capables d'augmenter la perception des odeurs lorsque nous sommes affamés, induisant ainsi la consommation de nourriture. Il serait donc possible d'adapter nos actions et nos émotions par l'intermédiaire des ECs. De plus, l'olfaction met en jeu des processus de mémorisation complexe grâce une région spécifique du cerveau, le cortex olfactif (CO). Cependant, aucune étude à ce jour ne s'est intéressée à la possible régulation du CO par le système EC. Le projet a pour finalité de comprendre si et dans quelle mesure, le système EC contrôle les processus de mémorisation d'odeur dans le CO. Pour se faire, dans un premier temps nous allons développer un protocole permettant l'étude des processus de mémorisation et plus particulièrement la préférence d'odeur. Ensuite, nous prévoyons de perturber le système EC que ce soit dans le CO ou non et évaluer l'impact comportemental, à savoir si les animaux sont toujours capables de préférer une odeur et si cet effet est spécifique de la préférence ou s'il est retrouvé dans d'autres comportements de mémoire olfactive, telles que l'aversion d'odeur. Ainsi, cette étude nous permettra d'avoir une meilleure compréhension des mécanismes olfactifs, notamment ceux pouvant modifier nos actions suite à la mémorisation d'odeur.

La durée prévue pour ce projet est de 5 ans et sera réalisé chez la souris du fait de la complexité des mécanismes et des circuits neuronaux qui seront étudiés et qui sont conservés chez les mammifères, y compris chez l'homme, mais absents ou très différents chez les invertébrés. Nous prévoyons d'utiliser 1548 souris avec différentes approches comme par exemple des tests comportementaux de mémoire ou l'analyse de l'expression de protéine. D'un point de vue méthodologique, nous nous engageons à respecter la règle des 3R (remplacement, réduction, raffinement) :

Remplacement : Certaines expériences ont déjà été faites ex vivo en utilisant des méthodes alternatives (électrophysiologie ex vivo sur tranches). La complexité des circuits neuronaux conservés chez les mammifères y compris l'homme ne permet pas la mise en place de simulations numériques fiables. L'usage des invertébrés qui ont un système nerveux complètement différent serait inapproprié. Il demeure nécessaire d'avoir recours à l'expérimentation animale.

Réduction : Les animaux utilisés dans chacun des groupes expérimentaux n'excéderont pas 10 animaux c'est à dire le nombre minimal d'échantillons permettant l'application de tests statistiques classiques dans le domaine. 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. Aussi, le milieu d'élevage des souris est enrichi (matériel de nidation). Dans la période postopératoire les animaux seront évalués quotidiennement pendant 4 jours (au moins si des signes précoces apparaissent) en suivant une grille par scoring (points limites).

10506 L'accident vasculaire cérébral (AVC) est la 3ème cause mortalité et la première cause de handicap acquis chez l'adulte dans les pays industrialisés 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 aiguë de l'infarctus cérébral est réalisée 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 soient mises en place.

L'objectif de ce projet est de tester une stratégie cérébro-protectrice basée sur l'inhibition de la production d'espèces radicalaires de l'oxygène (ROS) après la reperfusion cérébrale. Les ROS sont à l'origine de nombreux mécanismes de mort cellulaire suite à un AVC. Une telle stratégie semble essentielle afin de protéger au mieux le cerveau suite à un AVC et ainsi améliorer le devenir des patients.

Pour cela, l'effet d'un inhibiteur de la production de ROS sera étudié à l'aide d'un modèle d'ischémie-reperfusion qui reproduit une recanalisation artérielle complète et immédiate telle que l'on peut l'observer chez l'homme après thrombectomie.

Cette étude sera réalisée chez la souris du fait que ce modèle a été développé et très bien caractérisé dans cette espèce. Les procédures seront organisées afin que toutes les manipulations douloureuses soient réalisées sous anesthésie générale associée à une couverture analgésique. Le suivi de la recanalisation vasculaire sera réalisé à l'aide d'un système doppler dans 3 conditions différentes sur 20 animaux par groupe (soit 60 souris) plus 5 animaux contrôle ischémie (Total 65 souris Swiss).

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. Notre projet correspond à l'étape de validation in vivo qui fait suite aux validations réalisées in vitro, et ne nous permet pas d'utiliser d'autres moyens que de tester notre modèle chez l'animal (souris). L'ensemble des connaissances et des acquis dont nous disposons dans la littérature rend cette espèce particulièrement intéressante pour étudier le potentiel effet cérébro-protecteur de notre stratégie thérapeutique. Les données de la littérature utilisant ce modèle ainsi qu'une étude de puissance statistique en amont, permettent de nous assurer que nous utilisons le nombre minimal d'animaux pour pouvoir conclure d'un effet de notre stratégie thérapeutique. Des points limites sont définis pour éviter toute souffrance potentielle des animaux. 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. Mots clefs : Accident Vasculaire Cérébral, infarctus cérébral ; tPA ; fibrinolyse

10507 Le muscle représente jusque 30% de la masse corporelle et participe à de très nombreuses fonctions telles que la locomotion ou le métabolisme de l'organisme. Malgré son importance il reste peu étudié alors qu'il est la cause (ou le siège) de nombreuses pathologies telles que les myopathies, la perte de masse musculaire ou le diabète de type 2, dont plus de 350 millions de personnes sont atteintes à travers le monde. Dans ces pathologies, les traitements actuels sont peu efficaces et peuvent conduire, à long terme, à des effets secondaires. Le muscle est par ailleurs un organe doté de sa propre horloge interne, l'aidant ainsi à moduler son activité au cours de la journée. Aussi, des perturbations de cette horloge altèrent la capacité à l'exercice des souris, la fonction mitochondriale du muscle et pourraient être en conséquence génératrices de troubles métaboliques

de cet organe, même si ce dernier point reste à démontrer. D'après la littérature, il semble que le stress réticulaire puisse conduire à de fortes perturbations des organes tels que le foie ou le tissu adipeux. Cependant, le rôle de ce stress, que ce soit dans les myopathies, l'atrophie musculaire ou les maladies métaboliques du muscle, reste à ce jour inexploré. Nous voulons donc déterminer si le stress réticulaire participe aux altérations fonctionnelles et métaboliques du muscle et si la modulation de l'horloge interne de cet organe modifie en conséquence la réponse au stress réticulaire.

Rev-erba est une protéine de l'horloge biologique dont le rôle est de rendre silencieux certains gènes de manière circadienne, c.à.d. à des moments précis de la journée auxquels ils ne doivent pas être exprimés (mais qui le sont de manière inappropriée dans la maladie). Nos résultats obtenus *in vitro* (avec des cellules) ou à partir d'expériences exploratoires récentes démontrent que Rev-erba non seulement régule la fonction mitochondriale du muscle et la voie de l'autophagie, mais aussi impacte la masse musculaire, la sensibilité à l'insuline et le stress réticulaire.

L'objectif de ce projet est de démontrer, grâce à des modèles murins d'invalidation ou de sur-expression, l'implication de Rev-erba dans la régulation de la masse musculaire, de la sensibilité à l'insuline et de la réponse réticulaire dans des modèles de stress aigus et chroniques. Ce projet fera donc avancer les connaissances sur les fonctions physiologiques de Rev-erba dans le muscle. Nous évaluerons aussi l'effet d'un activateur de Rev-erba sur le stress réticulaire, la masse musculaire et la sensibilité à l'insuline. Si l'effet est avéré, ces molécules pourraient être développées à des fins thérapeutiques dans le traitement de certaines myopathies, de la perte de masse musculaire ou dans le cadre du diabète.

Justification de l'expérimentation décrite et méthodes mises en œuvre pour réduire le nombre d'animaux :

Le muscle représente un carrefour métabolique en communication permanente avec d'autres organes tels que le foie, le système nerveux, le tissu adipeux ou le rein. Chacun de ces organes communique avec les autres via la libération de différentes hormones. En outre, l'activité du muscle varie au cours de la journée. Dès lors, Rev-erba pourrait moduler nombre de ses fonctions comme nous avons commencé à le démontrer récemment. Ainsi, mieux comprendre le rôle de Rev-erba nécessite d'évaluer son implication dans ces différents processus à différents moments du cycle jour/nuit à l'échelle de l'organisme entier *in vivo*, même si l'étude des mécanismes moléculaires responsables sera menée *in vitro* sur des cellules. De plus, nous devons déterminer si les activateurs de Rev-erb ont une action anti-atrophie musculaire et sensibilisateur de l'effet de l'insuline *in vivo*. Nous avons mis en place un modèle mathématique pour modéliser les variations circadiennes afin de diminuer le nombre de souris étudiées en faisant des prédictions sur l'heure d'administration optimale d'un activateur de Rev-erb. Enfin, des procédures standardisées nous permettront non seulement de diminuer la variabilité mais aussi de comparer les résultats des expériences menées, diminuant ainsi le nombre d'animaux étudiés. Le nombre total d'animaux sera de 2502 souris.

Méthodes mises en œuvre pour atténuer la souffrance ou le stress induit par les manipulations, et améliorer le bien-être des animaux :

Afin d'atteindre l'objectif, nous évaluerons la conséquence d'une invalidation ou d'une sur-expression de Rev-erba introduite au niveau du corps entier ou spécifiquement dans le muscle (souris génétiquement modifiées). Ces invalidations et sur-expressions n'engendrent, par elles-mêmes, aucune souffrance. Ces souris seront soumises à des stress métaboliques aigus ou chroniques et traitées ou non avec une molécule à visée thérapeutique. Les modèles utilisés sont des régimes diabétogènes, des restrictions alimentaires, des exercices physiques sur tapis roulant, des injections intramusculaires de glucocorticoïdes. L'ensemble de ces procédures est non douloureux pour les animaux.

Les procédures décrites, sauf l'utilisation de tunicamycine et de glucocorticoïdes, ont été acceptées par le comité local d'éthique en expérimentation animale sous les numéros CEEA022008R, CEEA092010 et CEEA132010R.

Il est important, s'agissant d'évaluer le métabolisme et l'activité physique de nos souris, que les animaux soient maintenus dans des conditions d'hébergement dépourvus de stress, et que nos animaux soient maintenus dans un statut sanitaire excellent. Ainsi, la souffrance potentielle

engendrée par les procédures mises en œuvre sera prise en charge grâce à l'utilisation d'analgésiques et d'anesthésiques dès que nécessaire. La procédure d'euthanasie sera mise en œuvre sous anesthésie (animal inconscient). Enfin, le bien-être de l'animal depuis sa naissance jusqu'à sa mort sera pris en compte grâce à un environnement contrôlé dépourvu de germes pathogènes, la présence d'abris et de jeux dans les cages, une surveillance quotidienne de l'état de santé des animaux, et la prise en compte de tout signe physique de stress ainsi que de la hiérarchie sociale.

10508 La participation du microbiote intestinal à l'axe de communication intestin-cerveau est dorénavant reconnu. Ces dernières années, plusieurs études chez le rongeur ont montré que l'administration de probiotiques (micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont ingérés en quantité suffisante, exercent des effets positifs sur la santé, au-delà des effets nutritionnels traditionnels) avait un effet positif sur la réponse au stress et sur les comportements de type anxieux et dépressifs. Dans cette étude nous étudierons chez la souris Balb/c les différences induites sur les comportements de type anxieux et dépressifs par l'administration de 6 probiotiques différents. Il s'agit de classer ces probiotiques selon l'intensité de leurs réponses dans un test de labyrinthe en croix surélevé et un de nage afin de pouvoir sélectionner les plus efficaces pour les futures études consacrées à élucider les modes d'action des probiotiques. Le gavage sera réalisé par des personnes expérimentées. Si le gavage entraînait une fausse route les animaux seraient euthanasiés.

Seule l'utilisation d'animaux permet d'étudier ce type d'interactions complexes entre un microbiote intestinal particulier, le fonctionnement du cerveau et la survenue de troubles comportementaux. Le nombre minimum de souris (180, c.à.d. 6 cohortes de 15 souris traitées et 15 souris contrôles) se justifie par les analyses comportementales qui nécessitent un minimum d'animaux pour être statistiquement exploitables. Les souris proviennent d'élevages reconnus et sont nés en captivité. Aucune souffrance animale n'est attendue dans cette étude, du fait de la faible invasivité des protocoles. Un suivi quotidien permettra de réagir de façon adéquate en cas de besoin. Les souris seront 5 par cage dans des conditions d'élevage et un enrichissement de milieu sous forme de sopalin à déchiqueter et de bâtons de bois à ronger est prévu. L'ensemble des soins donnés aux souris visera à satisfaire le mieux possible leurs besoins physiologiques et comportementaux, conformément à la législation. L'état de santé et de bien-être des animaux sera surveillé quotidiennement.

10509 La Protéine Précurseur du Peptide Amyloïde (APP) est à l'origine du peptide β Amyloïde (A β) et est impliquée dans la maladie d'Alzheimer (MA). Alors que nombreuses études sur la sécrétion et la toxicité du peptide A β ont été réalisées, la fonction physiologique d'APP dans le fonctionnement cérébrale reste inconnu. Après des échecs récents dans le développement de traitements anti-A β , il est absolument nécessaire de comprendre la fonction de l'APP dans le cerveau sain normal. Notre équipe a mis en évidence qu'APP participe à la voie de signalisation Wnt / Planar Cell Polarity (PCP) et nous avons également des preuves solides que Wnt5a est un partenaire d'APP. Dans ce projet, nous nous concentrerons sur le rôle physiologique de la protéine APP et son interaction avec la voie de signalisation Wnt pendant le développement du cerveau chez la souris. Nous étudierons comment ils participent à la formation et à la maintenance des synapses et le dysfonctionnement de l'APP pourrait contribuer à la maladie d'Alzheimer.

Le présent projet nécessite l'utilisation de 510 souris pour 5 ans. La règle des 3R a été considérée pour la mise en place de ce projet : 1) réduction, le nombre d'animaux utilisés est réduit au maximum pour nous permettre de générer des données exploitables ; 2) raffinement, les procédures sont adaptées à l'espèce et sont réalisées en réduisant au maximum le stress et la douleur des animaux. L'état des animaux sera vérifié quotidiennement pendant l'évaluation journalière (points limites) ; 3) remplacement, les études in vitro et sur animaux invertébrés ne permettent pas d'étude complexe du système nerveux central et du cervelet en particulier, le rongeur est donc une des espèces les plus appropriées pour ce type de projet de recherche. Les animaux génétiquement modifiés nécessaires à la réalisation de ce projet ont été générés chez la souris. De plus, les organes/tissus étudiés dans l'étude ne sont pas présents dans les organismes invertébrés.

10510 L'assistance circulatoire mécanique (ACM) est utilisée chez les patients avec une insuffisance cardiaque grave en attente d'une greffe cardiaque ou ayant une contre-indication à la greffe. Elle consiste en l'implantation d'une pompe artificielle afin de suppléer la défaillance cardiaque. L'ACM repose actuellement sur des pompes à débit continu qui soumettent le sang à des forces non physiologiques causant des altérations du facteur von Willebrand (VWF). Ceci se traduit par de fréquents saignements sous ACM car le VWF joue un rôle essentiel dans la coagulation. Le développement de nouveaux dispositifs d'ACM, permettant d'éviter les troubles de coagulation, est ainsi essentiel pour assurer une meilleure prise en charge des patients en insuffisance cardiaque. Les dispositifs d'ACM à débit continu induisent également une perte variable de la pulsatilité artérielle physiologique, paramètre également associé à la gravité des saignements sous ACM. Le but de ce projet est d'évaluer in vivo l'impact du niveau de pulsatilité artérielle sur les anomalies du VWF sous ACM. Notre hypothèse est que le maintien d'un niveau élevé de pulsatilité artérielle permet de diminuer les altérations du VWF sous ACM. Il n'est pas possible d'étudier ex vivo (par conséquent en l'absence de vaisseaux sanguins) l'effet de la pulsatilité artérielle sur le facteur Von Willebrand (VWF). Dans le respect de l'éthique, notre étude sera réalisée chez le porc, espèce recommandée pour l'évaluation des ACM. Trente-cinq porcs adultes White Landras de 40 kg seront utilisés pour cette étude. Chaque animal sera son propre témoin permettant de limiter le nombre d'animaux à inclure dans l'étude. Une analgésie ainsi qu'une antibioprofylaxie seront mises en place pendant la durée du protocole. Enfin, une évaluation pluri-horaire des paramètres physiologiques sera réalisée afin de limiter la douleur et le stress des animaux. Dans un 1er modèle porcin, nous évaluerons l'intensité des anomalies du VWF en fonction du niveau de pulsatilité artérielle sous ACM à débit continu. Dans un 2e modèle porcin, nous évaluerons la compatibilité vis à vis du VWF d'un prototype innovant d'ACM à débit pulsé. Si les résultats obtenus dans ces 2 modèles animaux sont concluants, nous pourrons alors ensuite tester chez l'homme différents dispositifs d'ACM respectant la pulsatilité artérielle.

10511 Les études précliniques permettent d'acquérir les premières connaissances sur le comportement d'un candidat médicament, indispensable avant les essais chez l'homme. Le développement préclinique fait en particulier appel à l'expérimentation animale, qui est une étape indispensable à la connaissance d'un futur médicament avant de l'administrer à l'homme. Au cours du développement préclinique, un grand nombre d'études sont effectuées afin de qualifier le candidat médicament sur le plan de la pharmacologie, de la pharmacocinétique ou encore de la toxicologie. Ces études sont constitutives d'une partie du dossier de demande d'autorisation de mise sur le marché (AMM) du futur médicament. Ce projet d'étude préclinique a pour but de déterminer l'effet de différents traitements sur la cicatrisation dans un contexte de diabète. Lorsque l'on se coupe ou se brûle, notre corps commence un processus en trois étapes pour réparer la peau endommagée que l'on appelle la cicatrisation. Tout d'abord, une réponse immunitaire provoque l'inflammation de la blessure pour prévenir les infections. Deuxièmement, de nouvelles cellules (une croûte) se forment sur la plaie, et enfin il y a la formation de tissu cicatriciel, qui apparaît pour guérir la plaie. Certaines blessures guérissent facilement tandis que d'autres peuvent prendre plus de temps, surtout si elles sont graves ou si la personne est atteinte d'une pathologie, comme la présence de diabète. En effet, un niveau élevé de sucre dans le sang causé par le diabète peut, au fil du temps, affecter les nerfs (neuropathie) et conduire à une mauvaise circulation sanguine. Cette mauvaise circulation sanguine complique l'arrivée du sang – qui est nécessaire à la réparation de la peau – au niveau des zones du corps touchées par des lésions ou des plaies. Ainsi, une complication sérieuse du diabète est un ralentissement du processus de cicatrisation, qui peut mener à une activité physique réduite et dans certains cas à des infections récalcitrantes dans les plaies. La lente guérison des blessures peut être particulièrement problématique si elle affecte les pieds d'une personne diabétique car si elle n'est pas traitée correctement, cela peut mener à un risque d'amputation. Pour notre projet, nous utiliserons un modèle de diabète adapté pour l'étude de la cicatrisation (« Wound Healing ») chez la souris. Ce modèle est facile à mettre en place et hautement reproductible. Afin d'étudier l'effet de traitements sur la cicatrisation dans un contexte de diabète, les souris seront rendues diabétiques par administration de la streptozotocine. Une plaie sera

ensuite induite sur le dos de l'animal et le processus de cicatrisation sera suivi quotidiennement en présence ou non du traitement à expérimenter. Pour ce projet nous pensons effectuer 20 études avec pour chaque étude, l'utilisation de 75 souris (6 groupes de 10 à 13 animaux), soit 1500 souris sur 5 ans.

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

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

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

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

Les souris seront suivies quotidiennement pour pouvoir identifier les signes de souffrance caractérisés par son comportement : les changements physiques (pelage, peau, yeux...), la mobilité, l'alimentation, l'agressivité, le poids du corps (mesuré tous les jours pendant la première semaine d'étude puis 3 fois par semaine) limité à une perte de 20% maximum par rapport au poids initial. Si l'animal présente de fortes souffrances avant la fin de la procédure, il sera euthanasié après concertation avec le référent du comité bien-être des animaux.

- « Remplacer » les modèles animaux :

Notre projet se focalise sur un modèle expérimental de cicatrisation dans un contexte de diabète nécessitant l'utilisation d'un modèle animal. Ce système est indispensable pour reproduire la physiologie d'un organisme entier diabétique tout en étudiant le processus de cicatrisation au niveau de la peau. Il n'existe pas de modèle cellulaire reproduisant nos procédures expérimentales.

10512 La sarcopénie est définie comme une perte de masse musculaire squelettique associée à une perte de la fonction ou de la force musculaire. La sarcopénie et la dénutrition sont des pathologies fréquentes chez les patients âgés ou atteints de cancer. Cependant, il n'y a pas de données concernant le mécanisme de la dénutrition et de la perte de masse musculaire chez les personnes obèses souffrant de maladies aiguës et chroniques. L'objectif principal de cette étude est de caractériser pour la première fois les changements de composition corporelle au cours de la dénutrition chronique chez un modèle de miniporcs Yucatan, en utilisant deux régimes alimentaires hypocaloriques différents (normoprotéique vs. hypoprotéique) chez des individus obèses et chez des individus normopondéraux. Les objectifs secondaires sont de comparer les modifications de composition corporelle, de déterminer les changements moléculaires, ainsi que les changements du microbiote intestinal, entre les animaux obèses et non obèses, en réponse aux différents régimes. Cette étude préclinique sera menée chez 36 miniporcs Yucatan, âgés de 24 mois, répartis en six groupes, soit trois groupes d'animaux non obèses nourris pendant huit semaines avec un régime alimentaire standard, un régime hypocalorique normoprotéique, ou un régime hypocalorique hypoprotéique, et trois groupes d'animaux obèses nourris avec exactement les mêmes régimes. Le poids corporel et l'épaisseur du muscle dorsal mesurés par échographie seront enregistrés toutes les 2 semaines pendant 8 semaines. La composition corporelle détaillée des miniporcs, par scanner, sera évaluée avant le début de l'expérience (T0), après 4 et 8 semaines de régime. Au début (T0) et à la fin de l'expérience à 8 semaines, seront réalisées des biopsies musculaires et des prélèvements de fèces en vue d'analyses moléculaires et d'une analyse du microbiote fécal, respectivement. Ce projet a été conçu de manière à prendre en compte la règle des 3R en éthique de l'expérimentation animale. **REMPLETER** : ce projet portant sur l'effet de la dénutrition sur le métabolisme et le microbiote, il est impératif de travailler sur un modèle animal proche de l'Homme en termes de physiologie nutritionnelle, tel que le porc. **REDUIRE** : le nombre d'animaux par groupe expérimental (N=6) a été réduit à son minimum nécessaire pour garantir une puissance statistique suffisante à la mise en évidence d'un effet du traitement sur les variables observées. **RAFFINER** : les approches d'anesthésie et d'imagerie envisagées dans le cadre de ce projet ont été conçues par un vétérinaire et validées au cours de nombreux projets antérieurs. De plus, le scanner X est la méthode de référence pour l'étude de la composition corporelle.

10513 La maladie du foie gras (NAFLD) est parmi les maladies hépatiques chroniques les plus fréquentes dans le monde et est souvent associée avec des anomalies métaboliques (obésité, diabète). Initialement, NAFLD est caractérisée par l'accumulation anormale de gras dans le foie (stéatose). Avec le temps, la stéatose peut provoquer une inflammation puis une fibrose hépatique. Les processus moléculaires conduisant au développement de la fibrose et de l'inflammation sont peu connus. L'équipe a récemment identifié l'Apolipoprotéine F (ApoF) comme facteur dont le niveau d'expression est fortement diminué chez les patients qu'ont NAFLD plus sévère. Synthétisée puis sécrétée par le foie, l'ApoF est localisée sur les lipoprotéines plasmatiques et peut donc agir sur le foie mais aussi les tissus adipeux et musculaires. Nos études préliminaires indiquent que la diminution de l'expression de l'apoF altère les capacités de stockage et de sécrétion des lipides par le foie. De plus, la surexpression de l'ApoF chez la souris réduit fortement le taux de lipides dans le sang et aurait un effet protecteur contre les maladies cardiovasculaires.

Cette étude a été conçue dans le but d'étudier le rôle de l'apoF dans le métabolisme lipidique dans le contexte de NAFLD. Nous modulerons l'expression de l'ApoF dans le foie (son seul site de synthèse) en utilisant des méthodes virales et non-virales puis nous étudierons les effets sur la production de triglycérides par le foie et leur utilisation par les tissus adipeux et musculaires. Nous étudierons également si les changements observés peuvent conduire à l'aggravation du NAFLD. L'étude de la régulation des lipides dans 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. Les différentes lignées utilisées dans nos procédures ne présentent aucun problème physique ou physiologique. Néanmoins, nous serons attentifs à observer si les animaux souffrent ou présentent un comportement anormal en lien avec le responsable du bien-être suivant les paramètres cliniques suivants, définissant les points limites :

- perte de poids de 15% ou plus (et, le cas échéant variations de l'ingestion de nourriture et d'eau) :
- apparence physique externe (piloérection, dos rond, signes d'infection, respiration anormale.)
- changement du comportement (hypoactivité, démarche anormale)
- réponses comportementales au stimulus externe

Les animaux présentant un de ces critères seront euthanasiés par dislocation cervicale après anesthésie par kétamine/xylazine dans une salle dédiée. Ce monitoring sera réalisé en lien avec le responsable du bien-être animal.

Nombre d'animaux utilisés : 578

10514 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, la chaleur est produite non seulement par vasodilatation des vaisseaux sanguins, mais également par induction locale de thermogénèse. Ce mécanisme pourrait influencer la mise en place de la réponse immunitaire adaptative 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 souhaitons ici prouver que de la chaleur est produite localement par thermogénèse en réponse à différents stimuli inflammatoires par des techniques d'imagerie préclinique, en comparant la réponse de souris normales et de souris transgéniques incapables de faire de la thermogénèse, et d'étudier la réponse humorale induite. Nos résultats pourraient 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 l'ensemble des expériences, nous prévoyons d'utiliser 80 animaux, pour une durée de 3 ans, en respectant le principe des 3R. Ce nombre d'animal nous permettra de tester l'effet de différents stimuli inflammatoires sur la production de chaleur chez des souris normales et des souris

incapables de faire de la thermogénèse. Remplacement : La compréhension des mécanismes étudiés nécessite une approche *in vivo* chez l'animal. En effet, le contrôle de la température fait intervenir de nombreux partenaires cellulaires et ne peut donc se faire que sur organismes vivants, ayant une physiologie et un système immunitaire proche de l'homme. Il est donc impossible de remplacer l'étude chez les souris par des modèles *in vitro*. Réduction : Des études longitudinales sur les mêmes animaux, ainsi que l'utilisation de contrôles internes à chaque souris (comparaison dans une même souris de la température dans le site drainant le site d'immunisation et dans un site contrôle), permettront de diminuer le nombre d'animaux nécessaires. Raffinement : Les modèles transgéniques choisis ont des phénotypes non dommageables. Le personnel est très compétent et les animaux sont maintenus sans isolement, avec enrichissement, avec une surveillance scrupuleuse de l'état de santé des souris par les opérateurs et les responsables du bien-être animal en plus des soins standards. Les immunisations sont réalisées sous anesthésie. L'imagerie est réalisée sous anesthésie, avec confort thermique et contrôle du rythme respiratoire et de la température de l'animal.

10515 Le méthotrexate (MTX) ou acide 4-amino-N10-méthyl ptéroglyglutamique est un analogue de l'acide folique utilisé en médecine humaine dans différentes indications selon la posologie employée. A forte dose quotidienne, ses propriétés cytotoxiques sont employées en thérapeutique anticancéreuse. A faible dose, en administration hebdomadaire, son usage est approuvé chez l'homme pour plusieurs maladies auto-immunes :

le MTX est ainsi devenu l'agent immunomodulateur le plus employé en dermatologie humaine aujourd'hui, à l'exception de la prednisolone.

Nous étudions l'intérêt thérapeutique du Méthotrexate est étudié chez plusieurs espèces animales. Il a déjà prouvé son intérêt dans le traitement de maladies dermatologiques d'origine immunitaire chez le chien. L'effet immunomodulateur et anti-inflammatoire couplé à la bonne tolérance de la molécule. Nous souhaitons également étudier l'intérêt de ce produit dans le traitement de maladies du cheval.

Dans l'espèce équine, différentes maladies auto-immunes ou à médiation immunitaire requièrent un traitement immunomodulateur long, de plusieurs semaines à mois. En l'absence d'autre alternative thérapeutique, les corticoïdes sont employés par voie systémique. Les effets secondaires sont très problématiques : fourbure aigue, infections intercurrentes secondaires, aggravation des troubles métaboliques existant chez les équidés à embonpoint. Avant de lancer des essais cliniques sur des chevaux malades, nous devons nous assurer de la dose nécessaire et de la voie d'administration idéale chez le cheval. Pour ce faire, nous souhaitons réaliser une étude de pharmacocinétique qui consiste à suivre, dans le sang, la molécule active, et déterminer la durée de persistance et la voie d'élimination. Pour cette étude, il est indispensable d'utiliser des animaux vivants et sains. Nous devons travailler avec des chevaux car la pharmacocinétique est variable en fonction des espèces et ne peut pas toujours être transposée. Nous travaillerons avec la dose considérée comme thérapeutique et non toxique, d'après les données de la littérature. Les chevaux utilisés ne devraient donc pas souffrir d'effets indésirables pendant nos essais. Le seul inconfort viendra des prises de sang successives nécessaires pour suivre la concentration du produit dans le sang pendant une journée. Durant toute l'expérimentation, les chevaux sont pris en charge par le personnel d'un hôpital pour chevaux, avec toutes les capacités de soins disponibles en cas d'effet inattendu. Notre équipe est spécialement formée à la médecine des équidés. Ils sont hébergés dans des conditions optimales, dans des box paillés le temps des essais, et dans de grandes pâtures le reste du temps.

Pour ce travail nous utiliserons 6 chevaux. C'est le nombre minimal nécessaire de chevaux pour comparer trois voies d'administration et déterminer ainsi la dose idéale.

10516 L'objectif global de notre projet est de contribuer à la compréhension des processus d'encodage et de stockage des mémoires chez les mammifères. Plus spécifiquement, nous souhaitons étudier les mécanismes sous-jacents la formation de la mémoire à long terme dans une zone spécifique du cerveau. Cette zone de cerveau a été impliquée dans plusieurs maladies humaines. Une meilleure compréhension de son fonctionnement en conditions normales est nécessaire afin d'identifier et de

comprendre les altérations, qui se manifestent en conditions 'anormales', telles que les maladies neuro-développementales ou neuro-dégénératives. Pour mener nos études, nous utilisons plusieurs modèles transgéniques murins nécessaires pour la réalisation de certains aspects techniques de notre projet. Ces souris seront soumises à une tâche d'apprentissage, impliquant soit la navigation spatiale, soit la reconnaissance/ l'exploration d'un environnement légèrement aversif suivie par d'autres manipulations (exemple : séance d'imagerie) visant à comprendre comment ces expériences modifient le fonctionnement du cerveau.

Notre projet nécessite un modèle complexe et intact, adapté à la réalisation d'une tâche comportementale (relevant du processus de mémoire chez l'homme) et pouvant être génétiquement modifié. L'utilisation des animaux de plus faible sensibilité n'est pas possible, car ils manquent la structure cérébrale impliquée. Les approches in silico actuellement disponibles ne permettent pas la modélisation d'un cerveau entier. Nous avons réfléchi à nos expériences de façon à respecter au maximum les règles de 3Rs (remplacement (mentionné ci-dessus), réduction et raffinement). Réduction : le nombre d'animaux a été défini d'un point de vue statistique afin de limiter le nombre d'animaux à ceux sont nécessaire pour assurer l'exploitation statistique de nos résultats. Nous estimons que le nombre d'animaux requis pour la réalisation de ce projet essentiel sera 2139 souris. Raffinement : les animaux seront hébergés d'une manière adaptée à leurs besoins, seront surveillés quotidiennement et recevront les soins adaptés. En particulier, une stratégie d'anesthésie très élaborée a été proposée, ainsi que plusieurs mesures pour éviter la douleur, la déshydratation et pour assurer le confort et le bien-être de l'animal. Plusieurs raffinements scientifiques sont également prévus afin de récolter un maximum de données scientifiques pour chaque souris. Le bénéfice attendu de notre projet est une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents les processus cognitifs, et, à long terme, comprendre comment ces processus normaux peuvent être perturbés en conditions pathophysiologiques.

10517 Le diabète est une maladie chronique caractérisée par une augmentation prolongée de la concentration de glucose dans le sang (hyperglycémie). Le diabète de type 2 (DT2) représente 90% des cas de diabète. A l'origine observé chez les patients âgés, il est de plus en plus diagnostiqué chez des enfants et des personnes jeunes. Il est associé à l'obésité, au manque d'activité physique et à une alimentation déséquilibrée. En 2017, 425 millions de personnes âgées de 20 à 79 ans étaient diagnostiquées diabétiques, soit une prévalence de 8.8%. Il est estimé que le nombre de patients diabétiques adultes sera de 630 millions en 2045, soit une prévalence de 9.9%. A noter, le nombre de patients souffrant de diabète de type 2 croît dans les pays développés mais aussi dans les pays en voie de développement (la prévalence est actuellement de 11% en Amérique du Nord et dans les Caraïbes et de 10.1% en Asie du Sud-Est). Pour l'OMS, le diabète deviendra la 7ème cause de décès dans le monde en 2030. Ces chiffres impressionnants démontrent l'enjeu majeur de santé publique de l'obésité et du diabète de type 2.

La physiopathologie du DT2 est complexe et peut être schématiquement résumée à deux anomalies :

1/ Un trouble de la sécrétion d'insuline, seule hormone qui permette de réguler le taux de glucose dans le sang

2/ Des troubles de la sensibilité à l'insuline qui se traduit par une action de cette hormone moins importante et donc une hyperglycémie.

Du fait du caractère polygénique (impliquant plusieurs gènes) de la maladie chez l'homme, les modèles animaux utilisés dans le cadre de la recherche de nouveaux traitements médicamenteux doivent présenter différentes facettes de la maladie ; il peut s'agir de modèles présentant une hyperglycémie et/ou une obésité et/ou une insulino-résistance. Le choix d'un modèle plutôt qu'un autre est réalisé en fonction du mécanisme d'action présumé du produit à tester et donc de la cible pharmacologique.

L'objectif de ce projet sera ainsi d'approfondir nos connaissances sur des candidats médicaments et d'en évaluer leur efficacité après traitement aigu ou chronique par des tests d'efficacité in vivo/ ex vivo ou par des tests de caractérisation in vitro sur des organes ou cellules provenant de ces différents modèles de souris.

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

1) Remplacer : L'effet in vitro des composés ne peut pas être évalué sur des lignées cellulaires qui ne présentent pas d'état pathologique et qui, de plus, présentent des mécanismes modifiés. De plus, l'effet in vivo d'un produit sur le métabolisme glucidique et lipidique ne peut être évalué qu'après un traitement aigu ou chronique de plusieurs semaines chez l'animal et requiert la complexité d'un organisme vivant intégrant toutes les interactions hormonales et neuronales, ce qui n'est pas le cas sur des cellules ou organes isolés. Il n'y a donc pas de méthode substitutive.

2) Réduire : le nombre d'animaux utilisé dans les études a été déterminé pour assurer un effet des composés de 25% et une puissance statistique de 80%

3) Raffinement : Toutes les expériences sont réalisées dans des conditions qui limitent au maximum la douleur et les prélèvements sanguins nécessaires aux analyses biochimiques in vivo respecteront les volumes et temps de récupération nécessaires au respect du bien-être des animaux. Les techniques d'imagerie (dédiées à la quantification du tissu adipeux par exemple) sont non invasives et sans incidence sur le bien-être des animaux.

Dans ce projet, les souris, utilisées à l'âge adulte, sont hébergées en groupes sociaux dans des cages enrichies de bâtonnets de bois, de coton et d'une litière adaptée à la pathologie (polyurie due au diabète). Tous ces éléments leur permettent d'exprimer leurs comportements naturels tels que le fouissage, l'exploration ou encore la nidification. Dans certains cas, les souris pourront être hébergées en cage individuelle si un suivi de la prise alimentaire s'avère nécessaire. Tous les animaux font l'objet d'une observation visuelle, comportementale quotidienne, ainsi que d'un suivi de prise alimentaire et hydrique régulier.

Dans le cadre de notre approche de recherche de nouvelles molécules, on estime à environ 50 le nombre d'animaux par étude et on suppose pouvoir réaliser 30 études par an (soit sur 5 ans environ 7500 animaux).

10518 La pathologie ischémique cardiovasculaire est un enjeu de santé publique bien connu car représentant une des principales causes de décès des maladies cardiovasculaires. Un événement ischémique apparaît suite à l'obstruction d'une des artères qui irrigue le muscle cardiaque, entraînant la lésion des tissus et une modification de la fonction cardiaque. Un diagnostic précis de ce syndrome est indispensable car les patients hospitalisés en urgence puis libérés de façon inappropriés représentent un groupe à haut risque, avec un taux de complications fatales ou potentiellement mortelles allant jusqu'à 26 %. Il devient donc essentiel de détecter le plus précocement possible la survenue d'un événement ischémique afin d'en réduire sa morbi-mortalité. Actuellement un diagnostic rétrospectif d'un syndrome coronarien aigu bref est guidé par la clinique, dont l'Electrocardiogramme, et la troponine mais ne sont pas suffisants. D'autres techniques diagnostiques sont donc nécessaires et l'imagerie moléculaire en fait partie.

L'objectif de cette étude est de mettre au point une méthode de diagnostic précoce par imagerie isotopique pour la détection de périodes ischémiques cardiaques. Un polysaccharide radiomarqué est particulièrement étudié.

Le radiomarquage de ce polysaccharide est décliné sous plusieurs formes pour être adapté à l'imagerie TEP (Tomographie par Emission de Positron) et l'imagerie TEMP (Tomographie par Emission Mono-Photonique).

Pour chaque modalité d'imagerie, la mise au point du radiomarquage et l'évaluation de sa capacité de fixation à un site ayant subi une ischémie nécessite l'utilisation d'animaux sains ou ayant eu l'induction d'une ischémie cardiaque. Avant la première injection à l'homme d'un radiotraceur, il est requis de déterminer sa biodistribution et sa pertinence clinique (sensibilité, spécificité) chez l'animal, le recours aux modèles murins se faisant en première intention.

Les mesures nécessaires seront prises pour limiter la douleur et le stress des animaux par l'utilisation d'anesthésiants et d'analgésiques au cours de l'induction du modèle d'ischémie cardiaque et de l'imagerie. Un suivi du bien-être des animaux sera fait au cours de ce projet par un contrôle régulier de l'état de santé des animaux avec recours aux analgésiques si nécessaire, notamment sur les animaux ayant eu l'induction du modèle d'ischémie cardiaque. L'acquisition des images in vivo n'étant pas douloureuse, l'animal est maintenu sous anesthésie gazeuse légère uniquement pour limiter ses mouvements et son stress.

L'utilisation de systèmes d'imagerie in vivo dédiés au petit animal permet de réduire le nombre d'animaux nécessaires en comparaison des méthodes standards de comptage tissulaire avec euthanasie des animaux à chaque acquisition de données. En effet, avec l'imagerie, le même animal peut être suivi au cours du temps et peut être imagé à plusieurs reprises avec un résultat obtenu rapidement sans euthanasie de l'animal. Cela permet également de renforcer la pertinence scientifique, le même animal étant son propre témoin tout au long de l'étude.

Cette évaluation nécessite l'utilisation de 584 rats de type Wistars sur 5 ans. L'ensemble des animaux seront sacrifiés en fin d'expérimentation.

Après la réalisation de ce projet et la validation sur animal de l'efficacité de détection précoce d'un événement ischémique par imagerie isotopique TEP et/ou TEMP, la preuve de concept se poursuivra chez l'homme au cours d'essais cliniques.

10519 Au cours du développement préclinique d'un candidat médicament, il est essentiel de pouvoir étudier son impact sur le métabolisme in vivo regroupant la fonction rénale, alimentaire/hydrique ainsi que digestive. La mesure du métabolisme in vivo est possible grâce à l'utilisation de cages à métabolisme spécialement conçues pour mesurer la consommation alimentaire et hydrique, le volume d'excrétion urinaire et la quantité de fèces produites pendant 24 heures. Cette méthode d'évaluation du métabolisme général se réalise de façon générale chez le rongeur et permet donc d'évaluer de potentielles variations du métabolisme après administration d'un candidat médicament mais également ces études permettent d'évaluer l'efficacité d'un médicament dont la fonction est d'agir sur la diurèse comme les diurétiques, par exemple, qui représentent une des classes de médicaments les plus prescrites. Les diurétiques sont des substances qui inhibent la réabsorption rénale du sodium et provoquent donc une élimination urinaire d'eau et de chlorure de sodium. Leurs indications principales concernent l'hypertension artérielle et les insuffisances cardiaque et rénale. La détermination de l'efficacité d'un diurétique en préclinique s'avère donc utile.

La présente demande d'autorisation de projet décrit l'utilisation, dans son ensemble, des cages à métabolisme chez le rat. Celles-ci permettent de mesurer de façon non invasive les effets d'un candidat médicament sur la prise alimentaire et hydrique, ainsi que le volume d'excrétion urinaire et la quantité de fèces produites pendant 24 heures. En effet, l'utilisation de cages à métabolisme est la méthode la plus facile pour obtenir les échantillons d'urine et de fèces car ces cages sont conçues de telle sorte à ce que les urines et les fèces soient séparées sans qu'elles ne soient contaminées par la nourriture, l'eau ou les poils. Deux procédures d'utilisation des cages métaboliques chez le rat seront décrites ici : une procédure visant à mesurer les effets de l'administration d'un candidat médicament sur la fonction rénale uniquement incluant la mesure de la diurèse couplée à un bilan urinaire biochimique et une deuxième procédure complète visant à mesurer l'ensemble des paramètres : prise alimentaire et hydrique, ainsi que le volume d'excrétion urinaire et la quantité de fèces produites pendant 24 heures. Dès que cela est possible, la durée de mesure de prise alimentaire et hydrique ainsi que la production d'urine et de fèces sera réduite pour minimiser le temps d'isolement de l'animal. L'administration du candidat médicament peut de réaliser par différentes voies d'administration, elle peut être réalisée par voie orale, sous cutanée ou intrapéritonéale est réalisée sur animal vigile en contention.

Ce projet sera réalisé en respect avec la réglementation en vigueur. Aussi, une importance particulière sera apportée au respect de la règle des 3R. Dans ce cadre, le nombre d'animaux inclus pour ce projet a été estimé par un calcul de nombre nécessaire de sujets par groupe expérimental et pour une étude pharmacologique classique, 50 rats seront inclus par série expérimentale. En général, 5 groupes doivent être réalisés afin de tester l'efficacité d'un candidat médicament avec l'utilisation d'un groupe de rats sains, d'un groupe de rats malades traités avec du placebo, un groupe de rats malades traités avec un médicament efficace donné en clinique et un groupe de rats malades traités avec le candidat médicament administré oralement à 2 doses.

En tant que prestataire de service, nous estimons à 10 séries expérimentales sur 5 ans, soit 500 animaux. Pour l'ensemble de nos protocoles, un suivi clinique des animaux sera réalisé quotidiennement de manière à contrecarrer toute modification physiologique ou douleur anormale. Pour cela, des points limites ont été établis sur la base de la grille d'évaluation du stress et de la douleur afin de réduire voire d'interrompre la douleur ressentie. Il est toutefois à noter que pour

l'utilisation des cages métaboliques, la procédure n'est pas invasive et n'engendre pas de souffrance à l'animal.

10520 Il est maintenant bien établi qu'il existe une formation de nouveaux neurones tout au long de la vie dans l'hippocampe des mammifères, et que ce phénomène appelé néo-neurogénèse, joue un rôle dans la mémoire spatiale. L'hippocampe est une structure clé impliquée dans les processus mnésiques. Les neurones ainsi formés, neurones granulaires, viennent s'intégrer au sein de la population de neurones granulaires, formés durant le développement. La caractérisation de cette néo-neurogénèse, au travers de nombreuses études, peine à montrer une différence fonctionnelle entre les néo-neurones (neurones formés après la naissance) et les neurones formés durant le développement embryonnaire. Toutefois, des études menées au sein du laboratoire ont montré qu'un apprentissage spatial dans un labyrinthe aquatique, chez le rat mâle, active ou recrute spécifiquement les neurones formés à l'âge adulte mais pas les neurones nés au 7ème jour de vie (période néonatale). Ces études reposent sur des injections d'analogues de la thymidine (BrdU : 5-bromo-2'-deoxyuridine ; CldU : 5-chloro-2'-deoxyuridine ; IdU : 5-Iodo-2'-deoxyuridine) chez des rats âgés de 7 jours ou de 2 mois. Ces analogues vont s'insérer dans l'ADN des cellules en division et permettre ainsi la visualisation de ces néo-neurones par des techniques d'immuno-histochimie. Puis après avoir soumis les animaux à un apprentissage spatial, ceux-ci ont été sacrifiés et l'activation des neurones « étiquetés XdU » a été analysée en visualisant Zif268 ou cFos qui sont des gènes d'expression précoce, en d'autres termes des marqueurs d'activité.

A partir de ces données, nous étudierons le recrutement de neurones formés pendant les périodes embryonnaire (E18-19), juvénile (14 jours) et adolescente (28 jours) pour conforter un recrutement spécifique des néo-neurones dans l'apprentissage spatial. Pour cela, nous injecterons un analogue de la thymidine (BrdU) chez des femelles gestantes (E18-19), des animaux juvéniles (14 jours) et adolescents (28 jours). Cet analogue va s'insérer dans les cellules en division et permettre ensuite d'étudier spécifiquement les neurones nés au cours des périodes embryonnaire (E18-19), juvénile (14 jours) et adolescente (1 mois). Grâce à des techniques de double marquages immuno-histochimiques (analogue de la thymidine : BrdU + gène d'expression précoce Zif268 ou cFos), nous pourrions étudier l'activation de ces néo-neurones suite à un apprentissage spatial. Notre projet repose sur une approche intégrée nécessitant les capacités cognitives de l'animal. Un tel travail ne pourrait être effectué par une approche in vitro, ou in silico, les mécanismes sous-tendant l'intégration de ces neurones étant en grande partie inconnus, complexes, et impliquant le fonctionnement du système nerveux dans son intégrité (impossible à modéliser). Nous utiliserons un total de 480 rats mâles de la souche Sprague-Dawley. Le nombre minimal d'animaux utilisés par groupe est défini d'après les études préalablement menées au sein du laboratoire. Ce nombre tient compte des aléas des expérimentations et de la nécessité d'avoir une cohorte d'animaux statistiquement satisfaisante afin d'étudier l'activation des néo-neurones embryonnaires et juvéniles suite à un apprentissage spatial. Les approches utilisées seront raffinées notamment par l'utilisation d'analgésie en cas d'apparition de douleur ainsi que la surveillance quotidienne des animaux afin de s'assurer de leur bien-être. En cas de mise en danger du bien-être des procédures ont été mises en place et des points limites ont été définis en accord avec la vétérinaire responsable. Les animaux seront hébergés dans des cages collectives enrichies avec des rondelles de nid de peuplier compressées jusqu'aux procédures comportementales où ils seront alors hébergés en cage individuelle enrichie (rondelles de nid de peuplier compressées).

10521 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 cagés 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 une procédure spécifique dans notre Demande d'Autorisation de Projet utilisant des Animaux à des Fins Scientifiques.

Des expériences sont ainsi envisagées chez l'animal (souris) pour la procédure suivante : Cancer de la prostate.

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 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 de transgénése 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 (40 animaux) pour cette étude « Approche Imagerie », d'une durée totale de 2 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 20 animaux par an, soit un nombre total et maximal de 40 animaux sur 2 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.

10522 Les biomatériaux de substitution osseuse sont étudiés afin de développer des produits de substitution osseux utilisés chez l'Homme lors de fracture ne cicatrisant pas spontanément, afin d'obtenir une arthrodeuse (intervention chirurgicale visant à immobiliser définitivement une articulation), de combler une perte osseuse trabéculaire dans certaines affections comme

l'ostéoporose... Il est possible, dans ces indications, d'utiliser des autogreffes, des allogreffes voire des xéno-greffes. Toutefois, le volume de l'autogreffe est limité et il a été montré que le site de prélèvement est à l'origine chez un certain nombre de patients de douleurs importantes pouvant persister pendant plusieurs mois (11% à 1 an). Pour les allogreffes et les xéno-greffes, le problème de la stérilisation sans dénaturer la structure osseuse est primordial pour éviter la transmission de maladies et n'est toujours pas parfaitement résolu. C'est pourquoi, l'utilisation des biomatériaux de synthèse est une voie de développement.

Les biomatériaux que nous étudions font toujours l'objet d'études in vitro en préalable des études in vivo. Ces études in vitro permettent d'éliminer certains biomatériaux en raison d'effets délétères. Néanmoins, une étude in vivo est nécessaire avant l'utilisation en chirurgie humaine afin d'apprécier les effets et les interactions sur un organisme vivant. Il s'agit d'ailleurs d'une recommandation de la norme ISO 10993-6 lors du marquage CE. Le Lapin, les petits ruminants et le Chien sont les espèces les plus utilisées dans ces modèles in vivo.

Ces modèles animaux correspondent donc à des modèles que nous réalisons depuis des années et plusieurs fois par an afin d'étudier :

- * un nouveau biomatériau (face à un matériau de référence),
- * l'adjonction de principe actif ou de cellules à un biomatériau connu afin d'améliorer sa bioactivité,
- * l'effet d'un traitement par voie parentérale concomitant à ces implantations...

L'application de la règle des 3R sera effectuée comme suit :

Les biomatériaux implantés font l'objet d'une étude préalable in vitro avant d'être implantés chez l'animal afin de réaliser une première sélection. Le phénomène de résorption-substitution est évaluée par les techniques d'histologie classique, microscopie électronique à balayage, analyse d'image, Raman, vitesse de minéralisation, etc.

Le nombre d'animaux est réduit au maximum grâce à l'utilisation de statistiques non paramétriques et en veillant à réduire la variabilité.

La réalisation des interventions par des chirurgiens vétérinaires expérimentés permet de réduire le traumatisme chirurgical. Outre la gestion de l'analgésie pré et postopératoire, l'état général et clinique des animaux est surveillé de façon quotidienne par le personnel animalier et par un vétérinaire pour estimer une éventuelle gêne ou douleur. Cette évaluation journalière permet la mise en place, si nécessaire, d'un traitement le plus précocement possible. Les animaux seront hébergés selon la réglementation en vigueur avec un enrichissement du milieu.

Les tests statistiques non paramétriques permettent de travailler sur des effectifs faibles et ainsi de réduire le nombre de lapins utilisés.

Sur la période de 5 ans, 60 lapins seront utilisés.

10523 A travers plusieurs mandats français et européens de référence sur des virus épizootiques ou zoonotiques émergents ou à risque d'émergence (Fièvre catarrhale ovine, West Nile, Fièvre aphteuse...), nous cherchons à assurer une surveillance optimale de ces infections virales chez les espèces sensibles, par l'amélioration des outils de diagnostic et de recherche. Cette activité nécessite notamment la constitution de banque de sérums, bien caractérisés et repose sur la production d'antigènes recombinants (réactifs non infectieux, plus facilement échangeables et standardisables) et de sérums animaux dirigés contre ces antigènes. Ainsi, les sérums polyclonaux obtenus après immunisation de lapins avec des protéines recombinantes (et en présence d'adjuvant) ou de virus non réplicatifs pour cette espèce serviront au développement et à la validation d'outils sérologiques (Séroneutralisation, développement de tests ELISA ou Western-Blot par exemple).

Les lapins sont utilisés pour leur capacité à produire des grandes quantités de sérums et donc d'anticorps dirigés contre des antigènes d'intérêt, permettant ainsi de réduire le nombre d'animaux requis pour cet objectif. L'antigène, pouvant être une protéine recombinante (exprimée en système eucaryote ou procaryote) ou un surnageant de culture de cellules eucaryotes infectées, sera administré 3 fois (en présence d'adjuvant) afin de permettre la production d'un sérum polyclonal de bonne qualité et en quantité satisfaisante. Les animaux seront hébergés par paire dans des cages aux dimensions adaptées, avec un milieu enrichi pour optimiser les conditions d'hébergement. Les prélèvements terminaux de sang en vue de la récupération des sérums contenant les anticorps

polyclonaux seront effectués sous anesthésie, avec une surveillance permanente des animaux, puis euthanasie avant le réveil. Le projet présenté ici prévoit l'utilisation maximale de 20 lapins sur une période de 5 ans.

10524 La trisomie 21 ou syndrome de Down est une maladie grave caractérisée par la triplication de tout ou partie du chromosome 21. La trisomie 21 est la première cause de retard mental d'origine génétique affectant 60 millions de personnes dans le monde.

Des modèles ont été développés chez la souris afin de comprendre les mécanismes déficients et de tester des traitements potentiels contre la trisomie 21. La lignée Ts65Dn est la plus étudiée car les souris triploïdes sont viables et expriment plusieurs phénotypes qui évoquent certains symptômes chez les individus exprimant la trisomie 21. Notamment, les souris Ts65Dn sont caractérisées par des déficits cognitifs (mémoire spatiale, reconnaissance d'objets, mémoire de travail, apparition précoce de la maladie d'Alzheimer), psychomoteurs (coordination motrice, hyperactivité) et métaboliques (obésité, diabète de type 2).

Des données issues de la littérature suggèrent que le récepteur cannabinoïde de type 1 (CB1) constitue une cible potentielle pour le traitement de ces symptômes, bien qu'inexplorée à ce jour. Notre laboratoire a développé une banque de composés synthétiques innovants permettant de moduler certaines conséquences cellulaires et comportementales de la sur-activation des récepteurs CB1.

Doté d'un excellent index thérapeutique dans le cadre d'une autre pathologie du cerveau, le composé leader a obtenu l'autorisation d'administration chez l'homme.

6 composés, issus de la même famille et sélectionnés sur la base d'études in vitro, seront tout d'abord testés sur le phénotype de mémoire de reconnaissance des souris Ts65Dn. Un seul composé sera développé afin d'établir la preuve de concept préclinique de son efficacité contre les symptômes cognitifs, psychomoteurs et métaboliques de la trisomie 21.

L'ensemble de ce projet nécessite l'utilisation de 1656 souris sur 2 ans. Ce projet s'applique à des comportements intégrés. Il n'existe actuellement pas de modèle in vitro et donc de méthode alternative à l'utilisation des animaux. 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 utiliserons 12 animaux par groupe (6 mâles et 6 femelles), ce qui permettra de pouvoir faire des analyses statistiques cohérentes et le maximum sera fait pour utiliser les mêmes animaux dans plusieurs protocoles expérimentaux. Aussi, dans le respect du R de raffiner, il y aura une observation accrue des animaux surtout dans les protocoles avec un traitement chronique et/ou une restriction alimentaire et si nécessaire, une modification du protocole adaptée à l'état de l'animal sera mise en place.

10525 La maladie rénale chronique (MRC) est un facteur de risque majeur de survenue d'un accident vasculaire cérébral ischémique. Les patients avec une MRC sont exposés à des taux de toxines urémiques de 10 à 100 fois ceux observés dans la population générale. Elles peuvent avoir une neurotoxicité directe, et entraîner une dysfonction endothéliale cérébrale qui pourrait jouer un rôle important dans les anomalies des fonctions supérieures. Les solutés indoliques appartiennent à la famille des toxines urémiques liés aux protéines qui sont mal épurés par la dialyse. L'activation d'aryl hydrocarbon receptor (AHR) par les indoles entraîne une dysfonction endothéliale et une augmentation du risque thrombotique. De plus, AHR est largement exprimé dans le système nerveux central et il joue un rôle dans les lésions cérébrales induites par un AVC dans un modèle murin. En revanche, son rôle dans la sévérité des AVC survenant dans le contexte de la MRC est inconnu. L'objectif du projet est de mettre en évidence l'influence de l'insuffisance rénale chronique dans la sévérité des AVC ischémiques, dans un modèle préclinique chez le rat et de déterminer si l'activation d'AHR joue un rôle dans le mauvais pronostic des AVC survenant dans le contexte de la MRC.

L'imagerie isotopique pour l'évaluation de la sévérité de l'AVC (en particulier l'évaluation de la rupture de la barrière hémato-encéphalique, de la perfusion cérébrale et de l'apoptose neuronale) est une méthode expérimentale et nécessite une corrélation avec des données histologiques. Ceci n'est réalisable qu'avec un modèle animal. De plus, le modèle animal permettra une évaluation

neurologique est comportementale qui permettra une meilleure transposabilité de nos résultats chez l'homme.

Nous allons dans un premier temps caractériser l'atteinte neurologique dans un modèle d'insuffisance rénale chez le rat après une modélisation d'un l'AVC ischémique focal transitoire par occlusion de l'artère cérébrale moyenne (OACM) 14 jours après reperfusion, par des tests comportementaux par des techniques d'imagerie, en particulier la SPECT/CT pour caractériser la rupture de la barrière hémato encéphalique et l'apoptose cérébrale après reperfusion ainsi que le flux vasculaire cérébral jusqu' à 14 jours après l'OACM. Nous évaluerons la relation entre la sévérité de l'atteinte neurologique et la sévérité de l'insuffisance rénale, les taux de toxines urémiques ainsi que l'activation d'AHR.

Puis nous comparerons la sévérité des AVC en évaluant ces techniques d'imagerie, des tests neuro-comportementaux et l'histologie cérébrale chez les rats insuffisants rénaux et non insuffisants rénaux. Puis nous réaliserons la même série d'expériences chez des rats insuffisants rénaux saturés en toxines urémiques, puis des rats insuffisants rénaux et non insuffisants rénaux soumis à des inhibiteurs d'AHR.

Les procédures dureront 42 jours (28 jours de régime et surveillance puis réalisation de l'OACM à J28, puis surveillance neurologique et rénale pendant 14 jours après OACM), pour un projet d'une durée totale prévue de 5 ans. 15 rats seront évalués par sous-groupe, soit 540 rats au total. Le nombre d'animaux est réduit au minimum. Sur la base de nos travaux antérieurs, nous avons observé que l'évaluation histologique nécessite 15 animaux par groupe d'évaluation. Après calcul du nombre de sujets nécessaires par test de Mann-Whitney Wilcoxon, pour mettre en évidence une différence attendue de 50% de pourcentage de fixation du 99m-DTPA (évaluant la rupture de la barrière hémato-encéphalique) entre la population insuffisante rénale chronique et la population contrôle. Les évaluations neurologiques et rénales répétées permettront une approche longitudinale et ainsi de limiter le nombre d'animaux nécessaires.

Au cours de ces expériences sera mise en œuvre une surveillance attentive et quotidienne du bien-être des animaux selon la règle des « 3 R » (réduire, raffiner, remplacer). Les animaux seront évalués quotidiennement à l'aide d'une grille d'évaluation de la douleur adapté au rat pour ce modèle d'étude. Ceci afin de garantir que l'animal ne soit pas exposé à un niveau de douleur sans que l'on puisse y remédier. L'étude sera arrêtée chez l'animal proposant un score d'évaluation du bien-être correspondant au point limite de la grille.

Les résultats attendus sont : une aggravation de la sévérité des AVC chez les animaux insuffisants rénaux chroniques avec une augmentation de la taille de l'AVC, une augmentation de la zone de pénombre, une augmentation de l'apoptose, un retard à la reprise de la vascularisation cérébrale, et que cette sévérité accrue soit dépendante de l'activation d'AHR par les toxines urémiques.

10526 15 à 25 % des patients diabétiques développent une ulcération du pied. Cette plaie peut être le lit d'une infection bactérienne, le plus souvent plurimicrobienne, pouvant entraîner jusqu'à l'amputation du membre infecté. *Staphylococcus aureus* est une des bactéries majoritairement impliquées dans les infections de ces plaies de patients atteints de diabète. Ce pathogène se caractérise par des capacités d'adaptation à l'environnement et d'acquisition de résistances aux antibiotiques qui font que les cliniciens se retrouvent régulièrement confrontés à des bactéries multi résistantes vis-à-vis de l'arsenal antibiotique disponible. Cet arsenal n'est d'ailleurs quasiment plus alimenté depuis plusieurs décennies par l'apport de nouveaux antibiotiques, ce qui peut conduire à des situations d'impasse thérapeutique. Face à cette situation, l'exploration de nouvelles stratégies thérapeutiques est cruciale : optimisations des régimes thérapeutiques avec les antibiotiques disponibles, autres thérapeutiques qui pourraient agir en complément ou en remplacement des antibiotiques, et qui permettraient de limiter la pression de sélection exercée par ceux-ci sur les flores microbiennes des patients, et par conséquent l'apparition de souches résistantes.

Le but de notre étude est, à partir d'un modèle stable et reproductible de plaie diabétique infectée à *S. aureus* déjà mis au point, d'étudier l'efficacité clinique et microbiologique de l'administration locale d'une suspension de bactériophages versus une administration orale d'antibiotiques (amoxicilline + acide clavulanique), ainsi que l'impact de chaque thérapeutique sur le microbiote intestinal. L'organisation des expérimentations est synthétisée en annexe. Il est impossible de

passer directement à l'étude chez l'Homme, ce qui nécessite donc le travail sur un modèle animal stable et reproductible pour atteindre les objectifs du projet.

182 souris Swiss femelles seront utilisées au total.

Le travail sera divisé en différentes étapes (Annexe 1 Procédures Avril 2018 + Annexe 2 Chronologie Manip Phages) :

1. La 1^{ère} étape vise à effectuer le profil pharmacocinétique de différentes doses d'amoxicilline + acide clavulanique administrées par voie orale dans l'eau de boisson.

2. La 2^e étape vise à explorer par immunohistochimie l'infiltration des polynucléaires, marqueurs inflammatoires et de l'infection, au niveau des plaies des souris infectées, à H24 et H48 de l'inoculation, sans traitement. Cela permettra d'évaluer la cinétique inflammatoire aiguë juste avant traitement.

3. La 3^e étape consiste à évaluer l'efficacité clinique, bactériologique et l'impact sur le microbiote intestinal d'une suspension de bactériophages appliquée localement, comparée à l'administration orale d'antibiotiques de référence (amoxicilline + acide clavulanique) dans les plaies diabétiques infectées (sur un modèle murin de plaie diabétique infectée précédemment décrit).

Ce projet est réalisé dans le respect de la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner). Le nombre de souris par groupe a été réduit au minimum afin de garder une analyse statistique fiable et reproductible. Afin de limiter les sources d'angoisse ou de souffrance, la réalisation des plaies et de l'infection de ces plaies est faite sous anesthésie générale par isoflurane. Les souris sont conservées dans des cages de taille suffisante et enrichie avec des frisottis et un igloo, et dont la litière est changée une à deux fois par semaine et avec accès libre à l'eau et à la nourriture. Enfin le bien-être des animaux est surveillé tout au long de l'étude en évaluant l'état général des souris deux fois par jour avec analyse des signes généraux (poils hérissés, dos bossu, perte de poids, isolement...) et calcul des points limites selon le tableau joint (Annexe 3). En cas d'éventuels signes de souffrance avec symptômes non réversibles, l'animal sera euthanasié.

10527 Le psoriasis est une dermatose inflammatoire chronique évoluant par poussées, dont la pathogenèse résulte de facteurs génétiques et environnementaux, associés à une dysfonction immunologique caractérisée par une implication des voies pro-inflammatoires, cible des biothérapies actuelles. Les similitudes dysimmunitaires existant entre le psoriasis et la maladie de Crohn (MC) ont abouti à des approches thérapeutiques comparables mais aussi à des effets indésirables non négligeables.

Notre projet s'inscrit dans le développement d'une stratégie thérapeutique originale, basée sur l'utilisation d'une enzyme parasitaire, la P28GST, actuellement en essai clinique de phase 2 dans la maladie de Crohn et qui pourrait représenter une alternative efficace dans le psoriasis.

Le rationnel scientifique est basé sur les propriétés immunogéniques et anti-inflammatoires de cette enzyme provenant du parasite helminthe schistosome, dont le rôle inhibiteur de l'inflammation intestinale mais aussi cutanée a été démontré dans les modèles expérimentaux.

L'objectif du projet est d'étudier l'efficacité thérapeutique et immunomodulatrice de la P28GST dans le psoriasis, en utilisant un modèle préclinique de psoriasis induit par l'application topique d'imiquimod (IMQ) chez des souris mâles de souches BALB/c. Deux approches expérimentales seront comparées, l'une préventive, où l'immunisation par la P28GST aura lieu avant le traitement par IMQ, permettant d'envisager une approche immunomodulatrice à long terme, l'autre curative où la P28GST sera administrée pendant le développement de l'inflammation cutanée.

Au total 696 souris devraient être utilisées au cours de cette étude.

Afin de respecter le principe de réduction, le nombre de sujets nécessaires correspond au nombre minimum d'animaux requis pour une interprétation statistique et sans ambiguïté de nos résultats. Les effectifs ont été calculés grâce à des données de littérature et des données personnelles qui ont permis des calculs de puissance statistique basés sur le test de Mann et Withney. De plus, si les premiers résultats obtenus sont statistiquement significatifs et suffisamment homogènes, le nombre d'animaux et de répétitions d'expérimentations sera diminué.

Les conditions d'hébergement ainsi que les méthodes utilisées seront les plus appropriées pour réduire au maximum toute forme de souffrance physique et morale que pourraient ressentir les animaux. Les indicateurs de souffrance tels que le poil hérissé, l'absence de mouvement, une

baisse significative de l'activité motrice et/ou une perte de poids supérieure ou égale à 15% de la masse corporelle initiale seront observés quotidiennement.

Certains aspects concernant les effets de la P28GST et son mécanisme d'action ne nécessiteront pas l'utilisation d'animaux vivants et seront étudiés *in vitro* sur une lignée cellulaire de kératinocytes ainsi que sur des lignées de cellules immunitaires telles que les macrophages et les cellules dendritiques. Cependant, le modèle animal reste indispensable et nécessaire pour tester l'efficacité d'un traitement à la P28GST dans une maladie complexe et multifactorielle à l'échelle d'un organisme. Toute autre méthode expérimentale n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants ne pourrait apporter le même niveau d'information. Les échantillons et les données issues des animaux seront réutilisées dans plusieurs expérimentations *ex vivo* afin d'optimiser leur utilisation.

Les résultats obtenus auront une importance capitale dans le sens où ils permettront non seulement d'appréhender les mécanismes d'action de la P28GST mais aussi d'envisager la mise en place d'un essai clinique de Phase 2 chez des patients atteints de psoriasis.

10528 La maladie du greffon contre l'hôte (Graft versus Host Disease, GvHD) résulte de l'attaque immunitaire des tissus du receveur par les cellules T du donneur contenues dans une greffe. Les cellules lymphocytaires du donneur provoquent alors des dommages dans de nombreux organes (peau, foie, poumons) et entraînent un fort risque de mortalité. La GvHD est une complication majeure des greffes de moelle osseuse ou de sang. Ces greffes sont généralement réalisées comme thérapie dans plusieurs maladies telles que les leucémies aiguë ou chronique, l'anémie aplasique et l'immunodéficience congénitale. A ce jour, le seul traitement contre la GvHD est une administration de corticostéroïde ou d'agents immunosuppresseurs. Cependant afin de prévenir l'apparition de la GvHD chez les patients atteints de cancer et traités par thérapie cellulaire (nouvelle génération de traitements antitumoraux), il est possible de modifier génétiquement les cellules du donneur afin qu'elles ne puissent pas attaquer les tissus du receveur.

Ce projet a pour objectif d'évaluer le développement de la GvHD chez des souris immunodéprimées ayant reçu des cellules T génétiquement modifiées. L'efficacité de différentes modifications génétiques sur le développement de la maladie GvHD (absence de signes de GvHD ou retard et diminution des signes) sera évaluée. Ce projet permettra d'améliorer et accélérer le développement des thérapies génétiques qui sont en parties freinées par le développement probable de GvHD chez les patients traités.

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 la progression d'une maladie du greffon contre l'hôte dans un corps entier. En outre, des tests *in vitro* seront réalisés en amont mais la culture cellulaire ne permet pas de modéliser les différentes interactions cellulaires entre les cellules donneuses et les tissus hôtes. De ce fait, le suivi du développement de la GvHD se fera sur modèle murin très immunodéprimé injecté (injection unique ou répétée) de cellules donneuses humaines de types lymphocytaires génétiquement modifiées. Des souris très immunodéprimées sont utilisées afin de permettre la prise de la greffe des cellules donneuses. C'est un modèle standard couramment utilisé pour étudier la GvHD.

Des suivis cliniques et des pesées corporelles seront réalisés à intervalles réguliers et rapprochés afin de détecter tous signes anormaux spécifiques ou non de la GvHD chez les animaux. Les souches de souris utilisées étant immunodéprimées, une attention toute particulière sera portée à leur hébergement et leur environnement ainsi qu'aux soins de ces animaux afin d'éviter toute infection. Toute anomalie clinique observée sera rapportée à un vétérinaire dans le but de réaliser un examen clinique plus approfondi afin de respecter le bien-être de l'animal. Des mesures thérapeutiques seront mises en place pour essayer de traiter les animaux en fonction des signes cliniques observés sans interférer l'étude en cours (injection de fluides, d'analgésiques, isolement, réchauffement, etc.).

Lors de ce projet, 25 études sur le développement de la GvHD avec différents types de cellules donneuses pourront être réalisées sur 5 ans. Pour chaque étude, 50 souris pourront être utilisées. Au maximum, un total de 1250 animaux pourra donc être utilisé pour l'ensemble de ce projet.

Ce projet pourra permettre de réaliser des greffes de moelle osseuse ou de sang dans le cas de traitement de cancer sans complication de réaction de greffon contre l'hôte avec des cellules donneuses génétiquement modifiées n'engendrant pas de développement de GvHD.

10529 Ce projet a déjà fait l'objet d'une demande d'autorisation initialement acceptée sous le n° 00040.01 en 2013. Il s'agit d'un renouvellement.

La méthode par classe de toxicité aiguë est un processus séquentiel utilisant trois animaux d'un seul sexe par étape. Suivant la mortalité et/ou l'état moribond des animaux, deux à quatre étapes sont en moyenne nécessaires pour évaluer la toxicité aiguë de la substance d'essai. Cette procédure est reproductible, utilise très peu d'animaux et, comparée aux autres méthodes de toxicité aiguë (Lignes directrices 420 et 425), cette méthode permet de classer des substances par ordre de toxicité de façon similaire. La méthode par classe de toxicité aiguë est basée sur des évaluations biométriques avec des doses prédéterminées, convenablement séparées pour permettre de classer une substance pour des besoins de classification et d'évaluation des dangers. La méthode, telle qu'elle a été adoptée en 1996, a été validée de manière extensive in vivo par rapport à des données de LD50 de la littérature, tant sur le plan national qu'international.

L'essai de Toxicité aiguë selon la méthode par classe est réalisé dans le cadre de l'évaluation du risque toxicologique des substances chimiques. Les résultats sont destinés à générer des données sur le produit à étudier avant d'entreprendre des études de toxicologie (plus longues et nécessitant plus d'animaux) obligatoires afin d'établir les dossiers de demande d'autorisation à fournir aux autorités d'enregistrement.

Selon la ligne directrice OCDE 423, une substance est testée dans un processus séquentiel dans lequel trois animaux (souris ou rat) d'un seul sexe (normalement des femelles) sont utilisés à chaque étape. Une dose déterminée de la substance est administrée à un groupe d'animaux. L'absence ou la manifestation de mortalité liée à la substance dans un groupe ayant reçu une dose à une étape donnée détermine l'étape suivante, c'est à dire :

- arrêt de l'essai,
- administration de la même dose à trois animaux supplémentaires,
- administration de la dose immédiatement supérieure ou inférieure à trois animaux supplémentaires.

Ce processus séquentiel permet d'utiliser le moins d'animaux possible (3 animaux par groupe, entre 2 et 8 groupes selon le niveau de toxicité de la substance à tester, soit entre 6 et 24 animaux).

Le projet utilisera 120 animaux au maximum par an soit 600 animaux sur les 5 années d'autorisation de projet.

La symptomatologie toxique et les éventuelles doses létales de l'élément d'essai à étudier sont identifiées après administration unique chez le rongeur.

Après traitement, un suivi comportemental et pondéral des animaux est effectué. Tout animal montrant des signes cliniques modérés ou intenses, ou une perte de poids importante (>20%) fait l'objet d'une euthanasie. Les observations portent en particulier sur les modifications de la peau, des poils, des yeux et des muqueuses, ainsi que de l'appareil respiratoire, du système circulatoire, du système nerveux central et autonome, de l'activité somato-motrice et du comportement. L'attention porte en particulier sur l'observation des diverses manifestations de tremblement, convulsion, salivation, diarrhée, léthargie, sommeil et coma.

La méthode de toxicité par classe de toxicité aiguë permet le classement de la substance d'essai selon le Système Général Harmonisé de Classification (SGH) et d'Étiquetage des Produits Chimiques.

Il n'existe aucune méthode alternative réglementaire à l'utilisation des animaux pour ce type d'évaluation toxicologique.

L'étude est réalisée selon les recommandations de la ligne directrice de l'OCDE 423 (OCDE, 2008) et la directive 440/2008 de l'union européenne (CE, 2008).

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

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

Pour nos expérimentations, nous utilisons un processus séquentiel permettant d'avoir le nombre nécessaire et suffisant d'animaux, pour permettre le classement de la substance chimique selon le SGH.

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

Les animaux feront l'objet d'une surveillance rapprochée afin de détecter les points limites de souffrance.

- « Remplacer » les modèles animaux :

Le personnel impliqué dans les études est qualifié sur le plan technique et formé en continu sur les pratiques en expérimentation animale. Une surveillance régulière des animaux sera effectuée afin de déterminer toute douleur ou souffrance éventuelle qui sera prise en charge le cas échéant, et des points limites pertinents seront déterminés.

Il n'existe aucune méthode alternative réglementaire à l'utilisation des animaux pour ce type d'évaluation toxicologique.

10530 La microscopie intra-vitale permet de visualiser et de suivre des événements biologiques à l'échelle de la cellule sur un animal vivant. L'analyse d'un tissu, dans notre cas la glande mammaire et le foie, via l'implantation de dispositifs optiques chez la souris, nous permettra de collecter de manière spatio-temporelle des informations qualitatives et quantitatives sur les modifications vasculaires et structurales ainsi que sur les interactions cellulaires qui ont lieu durant la progression tumorale. Le but est de pouvoir visualiser des étapes clés de la progression tumorale à l'échelle de la microscopie optique pour les retrouver ensuite à l'échelle de la microscopie électronique. L'acronyme de cette approche est appelé CLEM pour « correlative light and electron microscopy ». Grâce à la CLEM nous disposerons d'une résolution sans précédent pour comprendre les mécanismes impliqués dans l'invasion (envahissement par les cellules tumorales du tissu environnant), l'intravasation (rentrée des cellules tumorales dans la circulation sanguine) et l'extravasation (sortie des cellules tumorales de la circulation sanguine). Pour cela il sera nécessaire d'associer simultanément différents marqueurs fluorescents pour l'identification des cellules (tumorales et saines) et leurs différents compartiments, d'injecter ces cellules tumorales à divers sites de la souris, puis de suivre la migration et les interactions de ces cellules tumorales lors des processus de disséminations métastatiques.

Réduire :

Le nombre d'animaux nécessaire a été déterminé au minimum mais néanmoins suffisant pour pouvoir réaliser une analyse statistique pertinente en tenant compte de la puissance du test statistique utilisé (sont prévus 2 séries indépendantes de 8 souris/groupe). De plus il utilise un système de microscopie intravitale qui permet un suivi longitudinal d'un même animal donc une réduction du nombre total nécessaire. L'injection des cellules cancéreuses et l'imagerie se font sous anesthésie et le reste des protocoles expérimentaux prend en compte l'impact sur la souffrance animale (notamment l'apparition de métastases hépatiques et pulmonaires) et différents critères ont été établis pour justifier un arrêt de l'expérience en cours.

Raffiner :

Le protocole expérimental prend en compte l'impact sur la souffrance animale et différents critères ont été établis pour éviter toute souffrance animale. Des points limites ont été établis pour éviter toute souffrance animale. Les souris sont maintenues en groupe de 5 par cage pour maintenir une interaction entre individus. L'environnement d'élevage est enrichi à l'aide de carrés de cellulose pour la construction des nids et de tunnels et de balancelle en plastique rouge pour favoriser l'activité des souris. Les souris ont accès ad libitum à une nourriture de type normal (RM1, Dietex) et à de l'eau filtrée. Si une souris présentait des symptômes traduisant l'apparition de douleurs (réduction de la réactivité, difficulté de locomotion, fourrure non entretenue, tendance à l'isolement) une injection en IP d'un analgésique sera effectuée jusqu'à disparition des symptômes.

Remplacement :

Le modèle animal est nécessaire car il n'existe pas de modèle pour reproduire in vitro la cascade d'événements qui sont analysés ici. Nous allons utiliser 7 lignées cancéreuses différentes, 3 types d'imagerie, 3 modes d'injections des cellules cancéreuses suivant le tropisme que l'on souhaite,

une analyse à 7 jours (extravasation) ou à 21 jours (macro-métastases), avec 8 souris/groupe. Les expériences seront répétées de manière indépendante soit au total 464 souris qui seront utilisées dans ce projet.

464 souris seront utilisées dans ce projet.

10531 La toxoplasmose est causée par le parasite apicomplexe *Toxoplasma gondii*. Chez l'homme adulte, la primo-infection passe le plus souvent inaperçue. Cependant, un lien entre une sérologie positive et les maladies mentales comme la schizophrénie est maintenant bien documenté. De plus, chez la femme enceinte, une primo-infection sera dommageable au fœtus avec par exemple, des avortements spontanés ou des séquelles oculaires plus ou moins graves chez les enfants. A ce jour, même si les traitements médicamenteux sont efficaces contre la forme proliférative du parasite et permettent de contrôler la dissémination parasitaire, ils occasionnent de nombreuses réactions secondaires (fièvre, éruptions cutanées, érythèmes). De plus, aucun traitement contre la forme chronique n'est disponible sur le marché. Le but de l'étude est de tester in vivo une nouvelle molécule, démontrée efficace pour limiter la prolifération in vitro du parasite, afin de déterminer son action lors des phases aiguë et chronique de l'infection. Nous avons déjà démontré que la molécule est peu toxique pour des lignées cellulaires ou des cellules primaires in vitro et qu'elle inhibe très efficacement la prolifération parasitaire in vitro. Nous avons ainsi estimé son index thérapeutique (rapport : dose létale à 50% / dose efficace à 50%) à 300, ce qui est en faveur d'un faible risque de toxicité in vivo.

Au cours de ce projet, 190 souris seront manipulées, permettant ainsi l'obtention de résultats statistiquement fiables. Leur surveillance clinique sera quotidienne et toute administration ou prélèvement sera réalisé sous sédation et/ou anesthésie. Un système de scoring (points limites) est définie pour éviter toute souffrance potentielle des animaux.

10532 L'objectif de ce projet est de mettre en place des stratégies pour optimiser l'efficacité thérapeutique du traitement pour la maladie de Pompe (MP). La MP est une maladie neuromusculaire rare (1/40000 naissances) causée par une mutation dans le gène GAA, ce qui entraîne une insuffisance de l'enzyme alpha-glucosidase acide (GAA). Cette enzyme permet de libérer du glucose dans les cellules à partir d'une réserve appelée glycogène. Le déficit en GAA provoque l'accumulation de glycogène dans tous les tissus, principalement le cœur, le diaphragme, les muscles squelettiques, le foie et les neurones. Cet excès de glycogène est toxique pour les cellules et conduit à des lésions tissulaires, et des symptômes multiples tels que cardiomyopathies, faiblesse musculaire, insuffisance respiratoire et déficits cognitifs. Les symptômes apparaissent typiquement entre 1.6 - 2 mois d'âge, et sans traitement, l'espérance de vie est inférieure à 2 ans.

Le seul traitement disponible pour la MP est la thérapie de remplacement enzymatique (ERT), qui est basée sur la perfusion hebdomadaire de la protéine GAA de synthèse dans la circulation sanguine. L'ERT améliore les fonctions motrices et respiratoires. Néanmoins, la GAA injectée est accumulée rapidement dans le foie et la rate avant d'atteindre le muscle à des niveaux suffisants, et l'efficacité est très variable chez les patients. Très fréquemment, les patients développent une réponse immunitaire contre la protéine de synthèse, même en présence d'immunosuppresseurs. Cette réponse annule l'efficacité du traitement, et par conséquent l'apparition d'une réponse immunitaire est associée à une courte espérance de vie du patient, à cause de la manque d'efficacité thérapeutique. Pour cette raison, la réponse immunitaire contre le traitement est l'objet de cette étude.

La thérapie génique (TG) consiste à apporter aux cellules une copie normale du gène muté, ici le gène GAA. Cette méthode présente divers avantages par rapport à l'ERT. La première est que le traitement ne nécessite pas de multiples injections; le but est que la correction soit permanente après une unique injection. La deuxième est qu'avec la TG, la protéine GAA est apportée à des niveaux constants et élevés dans tous les tissus cibles, notamment le muscle, ce qui améliore l'efficacité du traitement. Cependant, une réponse immunitaire est observée aussi dans le traitement par thérapie génique, ce qui réduit son efficacité.

Pour ces raisons, notre projet vise à tester l'efficacité d'une molécule dérivée de l'acide aminé tryptophane pour inhiber la réponse immunitaire dans deux situations : la première c'est la

prévention de la réponse immunitaire contre la TG quand elle est co-administrée avec le traitement; la deuxième c'est la réversion d'une réponse immune préexistante chez des patients ayant reçu au préalable l'ERT.

La réponse immunitaire est un système complexe qui implique de nombreux tissus et ne peut pas être remplacé par un système cellulaire. Le traitement étant destiné aux patients, il est nécessaire d'utiliser un organisme qui reproduit une réponse aussi proche que possible de celui de l'humain. Nous prévoyons ainsi de tester nos hypothèses thérapeutiques sur des modèles souris qui n'expriment pas la protéine GAA, comme chez les patients atteints de la MP.

Afin de respecter les règles de Réduction, nous avons sélectionné sur des bases bibliographiques une molécule unique pour réduire la réponse immune. La dose optimale est déjà décrite (molécule déjà injectée chez la souris dans des études bibliographiques).

Pour respecter le principe de Raffinement, en nous basant sur des données de la littérature, notre protocole est défini de façon à réduire au maximum le nombre d'injections et le temps de traitement nécessaire pour obtenir un effet mesurable. Aussi, l'utilisation d'analgésiques et d'anesthésiques lors des différentes injections et prélèvements de sang, et le choix de la veine faciale comme point de collecte de sang permettent de réduire la douleur. D'autre part, la maladie murine est très progressive, pour lequel les animaux seront utilisés avant l'apparition des symptômes.

Le traitement par TG empêche l'apparition des symptômes et n'apportera donc aucun dommage supplémentaire aux animaux. De plus, la molécule utilisée pour réduire la réponse immune devrait améliorer l'efficacité du traitement, apportant un bénéfice supplémentaire à l'animal. Des données de la littérature montrent qu'il n'y a aucun effet toxique à des doses supérieures à l'utiliser dans cette étude.

Nous avons déterminé le nombre minimum de souris à 12 par groupe afin d'obtenir une puissance statistique suffisante. Le projet durera 2 ans, et le nombre total de souris utilisé sera de 120.

10533 L'infection par les virus de type EBOLA induit des fièvres hémorragiques mortelles chez l'homme et le primate non humain. Néanmoins, il n'existe pas à ce jour de traitement ou de vaccin prophylactique. Récemment, la dissémination large et rapide du virus EBOLA du Zaïre (virus ZEBOV), sans précédent, a mis en évidence la nécessité de développer un vaccin pour lutter contre l'infection de l'homme par Ebola. Un vaccin efficace et sûr doit être capable de générer une réponse immunitaire forte et durable comprenant des anticorps et des lymphocytes T spécifiques capables respectivement de neutraliser le virus et d'éliminer les cellules infectées. Ce vaccin doit être utilisable pour la vaccination de masse dans les zones endémiques. C'est l'objectif d'un projet européen dédié aux études d'évaluation de vaccins candidats chez la souris dont nous sommes partenaires.

Des vaccins basés sur des vecteurs viraux incluant la glycoprotéine d'EBOLA (GP) sont actuellement en cours d'évaluation chez l'homme et les résultats obtenus sont encourageants, ce qui justifie le potentiel de la vaccination contre EBOLA. Néanmoins, ces vecteurs viraux, initialement développés pour lutter contre le bioterrorisme, ne sont pas adaptés à la vaccination de masse des zones endémiques pour des raisons de conception (risque, coût) et de stabilité de ces vecteurs. Il est donc envisagé de développer une famille de vaccins contre EBOLA pour la vaccination massive des individus des zones endémiques. Les vaccins proposés sont synthétiques et multivalents et donc plus sûrs. Ils sont composés de deux antigènes vaccinaux complémentaires, le domaine extramembranaire de la glycoprotéine (GP) de ZEBOV, cible d'anticorps protecteurs capables de neutraliser le virus EBOLA et cibles de lymphocytes T antiviraux, et/ou de longs peptides synthétiques dérivés de la GP ou d'une autre protéine virale, la nucléoprotéine (NP) sélectionnés *in vitro* pour leur capacité à induire des lymphocytes T antiviraux. Les propriétés immunogéniques de ces deux types de molécules spécifiques de la souche ZEBOV d'EBOLA doivent être évaluées dans une preuve de concept afin de déterminer leur capacité à générer une réponse immunitaire antivirale complète. Comme ces molécules sont des antigènes non vivants contrairement aux vecteurs viraux qui sont réplicatifs, elles ont besoin d'être formulées en présence d'adjuvants afin d'améliorer la vaccination. Elles doivent aussi être incluses dans des lipides pour augmenter leur rétention au site d'injection et donc la réaction immunitaire. Huit types d'adjuvants ont été sélectionnés pour leur capacité à potentialiser la génération des réponses T et B dans d'autres

vaccins et sur la possibilité de les utiliser chez l'homme. Leur capacité à augmenter la réponse B et T contre nos antigènes doit être déterminée. D'autre part, la combinaison de deux antigènes distincts (ici, une protéine et des longs peptides) dans une stratégie vaccinale en deux temps appelée « prime-boost » est décrite pour augmenter la réponse vaccinale. Dans ce contexte, l'objectif du projet présenté ici est de réaliser des études précliniques afin d'optimiser la formulation de ces vaccins dans des modèles de souris et de sélectionner deux vaccins candidats. Ces vaccins candidats optimisés chez la souris seront ensuite évalués chez l'homme dans trois essais cliniques en Europe puis dans deux zones endémiques.

Plus spécifiquement, la demande concerne la caractérisation immunologique de nos deux antigènes vaccinaux préparés dans différentes formulations adjuvantes et administrés par différentes voies d'immunisation dans un modèle murin afin d'identifier deux vaccins candidats. Cette étude préclinique se déroulera entre mai 2018 et avril 2021 (3 ans). Trois procédures seront mises en place successivement afin de : a) sélectionner le modèle murin permettant d'obtenir la meilleure réponse immunitaire contre nos deux antigènes préparés dans une première formulation appelée formulation de référence (procédure 1 - Période mai-juillet 2018) ; b) identifier une ou deux formulations adjuvantes optimales parmi sept formulations supplémentaires sélectionnées car permettant d'influer différemment sur l'exposition et la conformation des antigènes (procédure 2 – Période juil2018-janv2019) ; c) évaluer la voie d'administration des deux meilleures préparations d'antigènes formulés (cf. procédure 2) pour obtenir une protection optimale (réponse immunitaire durable dans le temps comprenant des anticorps protecteurs et des lymphocytes T spécifiques du virus ZEBOV) et étudier son mode d'action à long terme (appelée mémoire immunitaire) (procédure 3 –Période janv2018-avril2021).

Au total, nous aurons besoin de 310 souris pour répondre à nos questions biologiques sur 3 ans et obtenir des résultats statistiquement valides.

Le nombre d'animaux a été déterminé en tenant compte des 3Rs :

Réduction : le nombre d'animaux a été déterminé afin de pouvoir valider nos résultats statistiquement comme décrit dans les procédures 1-3.

Remplacement : Il n'y a pas actuellement de méthodes alternatives in vitro permettant d'évaluer la capacité d'un vaccin à générer des réponses immunitaires B et T durables.

Raffinement : Toutes les immunisations seront réalisées sous anesthésie gazeuse afin de réduire le stress lié à la vaccination.

10534 Le trouble du spectre autistique (TSA) est une maladie d'origine neurodéveloppementale, qui touche environ 1 enfant sur 70. Les facteurs génétiques, ainsi que les facteurs environnementaux jouent un rôle important dans l'étiologie de cette maladie complexe. Caractérisée par des troubles de communication, des problèmes d'interactions sociales et des comportements répétitifs stéréotypés, il n'existe aucun traitement ciblé pour améliorer la vie des individus atteints de cette maladie.

Ce projet porte sur la création, le maintien et la production d'une nouvelle lignée transgénique pour modéliser le TSA. Cette lignée sera créée grâce à un croisement entre deux lignées existantes et entraînera la suppression d'un gène qui est fortement impliqué dans l'étiologie du TSA. Grâce à l'utilisation d'une stratégie de recombinaison conditionnelle, l'expression du gène ciblé sera supprimée de manière très restreinte et sera limitée à une partie spécifique du cerveau. Cette stratégie évitera des conséquences négatives pour d'autres types de cellules du cerveau et d'autres systèmes tissulaires. Les souris issues de ce croisement seront utilisées pour un projet de recherche visant à comprendre les altérations neuronales présentes chez les modèles murins de TSA. Les bénéfices attendus de ce travail sont une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires sous-jacents le TSA, et, à terme, le développement de nouvelles stratégies pour le traitement du TSA.

En accord avec le principe des 3Rs (réduction, raffinement, remplacement), nous avons réfléchi à notre projet de production de façon à réduire au minimum le nombre d'animaux utilisé ainsi que la souffrance imposée par nos manipulations. Réduction : afin de ne pas produire plus que le nombre minimal d'animaux nécessaires pour nos éventuels projets de recherche, nous avons déterminé statistiquement le nombre minimal d'animaux requis pour chaque type d'expérience (demande de

projet complémentaire). Raffinement : les animaux seront hébergés de manière adaptée à leurs besoins et recevront une surveillance quotidienne et des soins adaptés. Des points limites sont définies et contrôlés régulièrement pour éviter toute souffrance potentielle des animaux. Remplacement : Les modèles de remplacement (in vitro) actuellement disponibles ne reproduisent pas l'architecture du cerveau et ne permettent pas la modélisation des processus complexes tels que le traitement de l'information sensorielle, la communication sociale, la perception de son environnement et la cognition.

Nous avons estimé le nombre total d'animaux nécessaires pour ce projet de production à 2500 animaux.

10535 L'État de Stress Post-Traumatique (ESPT) est un désordre psychiatrique qui se développe à la suite à d'un traumatisme sévère et brutal. Il n'existe aucun traitement couvrant l'intégralité des symptômes de l'ESPT. Les pharmacothérapies existantes sont de la classe des antidépresseurs qui n'apportent que peu de bénéfices au patient, et de nombreux effets secondaires tels que des risques d'insécurité d'emploi, des désordres concomitants et sévères comme l'anxiété généralisée et des troubles de phobie sociale et de panique. Les praticiens et les patients sont en attente de solutions thérapeutiques efficaces et sûres.

Des études d'imagerie cérébrales chez les patients ESPT ont démontré des anomalies au sein des régions du cortex préfrontal, de l'hippocampe et de l'amygdale, régissant la peur et son apprentissage, les mémoires contextuelles et les émotions.

Le récepteur mGlu7 (Classe C GPCRs), semble jouer un rôle majeur dans la diminution des troubles de la peur et de l'anxiété, et ce en rétablissant la transmission glutamatergique, dérégulée à la suite d'un traumatisme. C'est pourquoi des molécules modulatrices de ce récepteur sont développées et pourraient représenter une nouvelle piste prometteuse dans le traitement de l'ESPT.

Ces molécules n'étant pas encore autorisées en phase clinique, le recours à l'animal est indispensable. Nous utiliserons donc un modèle de stress chez le rat qui sera obtenu par une immobilisation associée à une odeur de prédateur (le chat) pendant 30 minutes.

Ce projet de recherche fondamentale d'une durée maximale de 5 ans vise à répondre à plusieurs questions.

- L'imagerie fonctionnelle (IRM et Tomographie par Émission de Positions avec injection de 18F-FDG) permet-elle de mettre en évidence des différences d'activation neuronale entre des rats sains et des rats stressés ?

- Si oui, les molécules ciblant les récepteurs mGlu7 permettent-elles de corriger ces différences de pattern d'activation cérébrale ?

- Si oui, il y existe-t-il un effet-dose pharmacologique ?

La première étude de validation de l'utilisation de l'imagerie fonctionnelle chez l'animal stressé nécessitera 36 animaux. Le projet ne sera poursuivi que si cette étude fournit des résultats positifs, validant le modèle animal en termes de différence de pattern d'activation, par rapport aux animaux contrôles.

L'étape 2 nécessitera 18 animaux par molécule et l'étape 3, qui ne sera réalisée qu'en cas de résultat positif à l'étape 2, nécessitera 36 animaux par molécule. Dans le but de réduire au maximum l'effectif de l'étude globale, les images obtenues chez les animaux lors de l'étape 1 serviront de groupe contrôle pour les étapes 2 et 3. Sur les 5 années à venir nous pensons avoir 4 molécules de la même famille pharmacologique à tester. Ceci porte notre effectif total à 252 rats.

Nous n'attendons pas de dommages physiques sur nos animaux. Les molécules sélectionnées sont des médicaments-candidats qui ont déjà été administrés aux mêmes doses chez le rat vigile lors d'études comportementales. Aucune manifestation clinique d'effet indésirable ou d'inconfort en aigu n'a été observé.

Nous réduirons au maximum le stress hors modèle en manipulant les animaux pendant la période d'acclimatation pour les habituer à l'opérateur.

10536 Depuis 2007, de nombreux essais de thérapie génique oculaire ont été menés avec dans l'ensemble une amélioration de l'acuité visuelle pour les patients ayant reçu une injection intraoculaire de vecteurs viraux codant pour un gène médicament (transgène). Cependant deux études récentes

ont montré qu'à partir de 6 mois après l'injection du vecteur viral, les patients présentent une perte secondaire de la vue qui pourrait être le résultat d'une réponse inflammatoire dirigée contre le transgène. Nous avons mis en évidence au laboratoire, une réponse inflammatoire au niveau local (rétine), ainsi qu'en périphérie (rate), faisant suite à une injection intraoculaire de vecteur viral. Cette approche expérimentale peut engendrer une atténuation visuelle partielle, temporaire ou permanente de leur œil droit injecté mais sans douleur. A noter que l'œil gauche non injecté sert systématiquement de contrôle négatif interne.

Nous souhaitons maintenant inhiber cette réponse inflammatoire, en injectant simultanément un vecteur viral et un composant anti-inflammatoire. En complément, une étude immunologique au niveau oculaire et périphérique sera effectuée afin d'étudier les effets anti-inflammatoires qui peuvent être différents au sein de la rétine et dans les organes lymphoïdes secondaires (eg. Rate). Ce projet s'inscrit dans le respect de la règle des « 3R » (Remplacement, Raffinement et Réduction) et du bien-être animal. Le respect de la règle des 3R est décrite ci-dessous :

Respect de la règle du Remplacement : Les produits injectés dans l'œil droit de chaque souris a déjà fait l'objet de test préalable in vitro. Ainsi l'efficacité de pénétration du vecteur viral en fonction de la dose utilisée et sa toxicité potentielle ont été testées sur des lignées cellulaires pour ne pas avoir à utiliser des animaux. Par ailleurs, ce projet consiste à étudier les conséquences immunologiques sur tout l'organisme suite à une injection du vecteur viral dans l'œil. A ce jour, l'étude globale de toutes les réponses immunitaires (locale et périphérique) à l'échelle de l'organisme entier (e.g. œil, rate, ganglions lymphatiques et sang) ne peut être réalisée qu'à l'aide d'un modèle animal.

Respect de la règle du Raffinement : les souris seront hébergées par groupes expérimentaux de 5 dès leur réception. La non redistribution ultérieure des animaux limite leur stress. Les animaux seront manipulés le moins possible afin de réduire leur angoisse et leur stress. Lors des injections ou manipulations (e.g. prélèvements sanguins), les animaux seront sous anesthésie générale. Une surveillance des animaux sera effectuée deux fois par jour par du personnel qualifié. Le jour de l'injection intra-oculaire et les jours suivants, les animaux feront l'objet d'un suivi particulier par l'expérimentateur et les zootechniciens. Des enrichissements environnementaux et du milieu seront ajoutés dans les cages (e.g. abris, nourriture adaptée aux rongeurs).

Respect de la règle de la Réduction : le nombre d'animaux utilisés, d'un total de 420, a été réduit tout en conservant une puissance statistique nécessaire pour l'exploitation des données et il tient compte des pertes potentielles observées dans les expériences antérieures. Les expériences seront maximisées afin d'obtenir un maximum d'informations en évitant le double-emploi d'animaux et en regroupant certains groupes d'animaux (e.g. groupe contrôle).

10537 Les maladies chroniques du foie représentent la principale cause de développement du carcinome hépatocellulaire et sont associées au syndrome métabolique (surpoids, diabète, obésité, hypertension, dyslipidémie). Le spectre de ces complications hépatiques (NAFLD : Non Alcoholic Fatty Liver Disease) va d'une stéatose simple (foie gras), à la stéatohépatite (Non Alcoholic Steato Hepatitis : NASH), puis à la fibrose, voire la cirrhose et à l'hépatocarcinome. Malgré l'importance clinique de ces maladies chroniques du foie, aucun traitement pharmacologique efficace n'est actuellement disponible.

La mise en place d'une inflammation à bas bruit dans le foie joue un rôle crucial dans le développement des maladies chroniques dans cet organe. Les macrophages font partie des cellules du système immunitaire impliquées dans les processus inflammatoires suite à un stress microbien ou métabolique. Ces cellules sont retrouvées en outre au sein du tissu adipeux et de l'intestin, acteurs extra-hépatiques qui participent au développement et à l'évolution des complications hépatiques. Notre équipe de recherche s'intéresse à la protéine kinase SYK, qui joue un rôle central dans la signalisation intracellulaire au cours des réponses inflammatoires médiées en outre par les macrophages.

Nos récents travaux publiés ont montré que l'inactivation de SYK dans des macrophages dérivés in vitro à partir de moelle osseuse prévient leur phénotype inflammatoire en réponse à des débris bactériens comme le LPS. De plus, nos données préliminaires montrent que l'expression hépatique

de SYK est fortement augmentée avec l'inflammation hépatique et corrèle avec les caractéristiques de la NAFLD (stéatose, inflammation et souffrance hépatique) chez les patients obèses.

Comme la protéine SYK est exprimée par plusieurs sous-populations de cellules immunitaires, son invalidation spécifique dans les macrophages nous permettra d'évaluer spécifiquement son rôle au sein de cette population immunitaire au cours de la stéatohépatite. Les macrophages et SYK pourraient ainsi servir de marqueurs de diagnostic chez les patients atteints de complications hépatiques.

Pour satisfaire au remplacement, nous réaliserons des études préliminaires in vitro sur des lignées cellulaires de macrophages. Cependant, il nous est nécessaire de réaliser des études in vivo car les études in vitro ne permettent pas de reproduire les interactions complexes qui existent entre les différents organes et entre les différents types cellulaires.

Pour satisfaire à la réduction, nous utiliserons un schéma de croisement qui génère 50% de souris contrôles et 50% de souris invalidées pour SYK ce qui évite la génération d'animaux inutiles. Nous prévoyons d'utiliser 120 souris sur une période de 5 ans.

Pour satisfaire au raffinement, nous serons particulièrement attentifs à tout changement physique ou de comportement. Leur bien-être sera scrupuleusement pris en compte dans toutes les procédures en termes de conditions d'élevage (température, hygrométrie), d'hébergement (présence de tige en coton et d'igloo dans les cages). Le suivi sanitaire quotidien assuré par les animaliers auquel s'ajoutent les visites régulières des expérimentateurs (au moins une fois par semaine en fonction des procédures) nous permettra de déceler précocement tout signe de stress ou de douleur et d'appliquer les points limites que nous avons définies pour chaque procédure. Durant la procédure, les animaux seront suivis en s'appuyant sur une grille d'observation qui a été affinée à partir des expérimentations précédentes et permettant d'évaluer et d'objectiver les éventuelles souffrances.

Il est à noter que les souris déficientes pour SYK dans les macrophages ne présentent aucun phénotype dommageable comme observé au sein de notre animalerie (souris viables, fertiles, de taille normale et ne présentent aucune anomalie physique et comportementale).

10538 La consommation de viandes et charcuteries est associée à une augmentation du risque de cancer du côlon. Les recommandations nutritionnelles actuelles sont d'en limiter la consommation. Des études expérimentales à l'aide de modèles animaux ont permis de déterminer les mécanismes impliqués : le fer est proposé comme le principal responsable de cet effet promoteur, et cela serait expliqué par sa capacité à induire une forte dégradation des lipides aboutissant à la formation de molécules toxiques, nommées aldéhydes, qui sont délétères pour les cellules du côlon. Par ailleurs, il a récemment été montré qu'un régime riche en fer limitait la capacité de bouclier de ces cellules coliques contre les toxiques présents dans notre alimentation : on parle de barrière intestinale altérée. Enfin, cette consommation riche en fer augmente l'inflammation et induisant une toxicité contre les cellules du côlon. L'objectif de cette étude est de regarder si ces effets délétères des aldéhydes (inflammation et toxicité) issus de la consommation de fer sont plus importants chez des souris ayant une barrière épithéliale intestinale altérée par rapport à ceux observés chez une souris présentant une barrière intestinale normale afin de vérifier si l'effet de la consommation de viande peut être aggravé lorsque la muqueuse colique ne remplit plus son rôle de bouclier. Si cela est le cas, ceci devra permettre à terme d'affiner les recommandations nutritionnelles. L'hypothèse est que l'altération de la barrière intestinale augmente d'une part la surface d'épithélium intestinal exposé aux aldéhydes et d'autre part le passage de ces composés toxiques à travers la barrière intestinale, augmentant ainsi les effets délétères des aldéhydes. Pour vérifier cette hypothèse, nous comparerons l'effet de la consommation de fer dans un modèle classique de barrière intestinale constitutivement altérée à l'effet dans un modèle de souris avec une barrière intestinale normale. Au total, 80 souris (40 souris mâles et 40 souris femelles) seront incluses dans cette étude. Il est nécessaire de séparer les mâles des femelles car les effets de la consommation de fer varient en fonction du sexe. Nous étudierons sur ces animaux la capacité de bouclier de la barrière épithéliale intestinale, la réponse inflammatoire et la toxicité au niveau de la muqueuse colique, ainsi que des marqueurs de d'oxydation des lipides dans les fèces. Cette étude sera conduite dans le respect du principe des 3R, le nombre d'animaux a été défini en fonction de données issues de la littérature

(10 souris par groupe), les conditions expérimentales grâce aux points limites et critères d'interruption définis en fonction du poids, et du comportement et l'utilisation de sondes de gavages à bout arrondi, éviteront la douleur et le stress animal. Les souris seront hébergées dans des locaux d'animalerie conventionnels, leur assurant les meilleures conditions de vie et de bien-être. A la fin de la procédure, les souris seront euthanasiées afin de prélever les muqueuses coliques. Le microbiote intestinal joue un rôle important dans la fonction de barrière intestinale, l'utilisation de modèle animal est donc indispensable pour intégrer l'ensemble des effets au niveau du côlon.

10539 L'autisme et les troubles du spectre autistique (TSA) forment un groupe de pathologies d'origine neurodéveloppementale qui touchent environ 1 sur 70 enfants. Les facteurs génétiques, ainsi que les facteurs environnementaux jouent un rôle important dans l'étiologie de cette maladie complexe. Caractérisée par des troubles de la communication, des problèmes d'interactions sociales, des comportements répétitifs stéréotypés, ainsi que des troubles liés à un traitement anormal de l'information sensorielle (hypersensibilité ou hyposensibilité sensorielle) les TSA posent un fort défi pour les familles des enfants atteints de cette maladie. À ce jour, il n'existe aucun traitement pharmacologique ciblé pour améliorer la vie des individus atteints de TSA. Les objectifs de ce projet, de caractère générique, sont 1) de caractériser les défauts de traitement de l'information sensorielle chez les modèles murins de TSA 2) de définir, à partir de ces données, les mesures physiologiques susceptibles de modification par les molécules thérapeutiques et 3) de tester les nouvelles molécules pharmacologiques afin de déterminer leur potentiel thérapeutique. Pour mener nos études, nous utilisons une approche électrophysiologique, effectuée sur des animaux sous anesthésie. Les bénéfices attendus de notre projet de recherche sont une meilleure compréhension des mécanismes neurobiologiques sous-jacents de cette maladie, et, à terme, l'identification de nouvelles stratégies thérapeutiques pour améliorer les symptômes de cette maladie. Pour réaliser ce projet de fort impact préclinique, le modèle animal est indispensable.

En accord avec le principe des 3Rs (réduction, raffinement, remplacement), nous avons réfléchi à notre projet de recherche de façon à réduire au minimum le nombre d'animaux utilisés ainsi que la souffrance imposée par la procédure détaillée dans ce document. Réduction : afin de ne pas utiliser plus que le nombre minimal d'animaux nécessaires pour que nos résultats soient statistiquement exploitables, nous avons déterminé (selon les études précédentes) la taille d'échantillon requis. Raffinement : les animaux seront hébergés d'une manière adaptée à leurs besoins et recevront une surveillance quotidienne. La séance d'imagerie sera effectuée sous anesthésie; plusieurs raffinements sont prévus pour veiller au confort de l'animal (utilisation d'une crème oculaire, stratégie pour éviter la déshydratation, maintien d'une température physiologique, utilisation d'un antidouleur local). Les études pilotes permettent la mise au point de la procédure. Remplacement : Le projet porte sur l'étude du traitement de l'information sensorielle dans le néocortex. Il nécessite, donc, la présence de circuits intacts, permettant la transmission des signaux électriques entre le système nerveux périphérique et le système nerveux central et entre les différentes zones cérébrales. Le modèle animal est absolument nécessaire pour reproduire la complexité de ces interactions neuronales et ne peut pas être remplacé par les études in vitro ou in silico. Certaines études antérieures ont été réalisées chez la drosophile et le poisson zèbre. Cependant les systèmes sensoriels de ces organismes sont très différents de celui des mammifères (ils manquent notamment la structure cérébrale ciblée chez l'homme) et le remplacement par ces modèles n'est pas possible. Néanmoins, pour veiller aux obligations de remplacement, nous avons conçu une stratégie expérimentale qui comprend la mise-au-point de nos approches thérapeutiques lors des tests in vitro. Seules les molécules ayant un effet bénéfique in vitro seront testées chez l'animal anesthésié. Nous avons estimé le nombre maximum d'animaux nécessaires à ce projet crucial à 2212 animaux.

10540 L'objectif du projet est d'évaluer les différentes méthodes de mesures de l'efficacité alimentaire individuelle chez les tilapias du Nil, *Oreochromis niloticus*.

L'objectif est d'avoir à la fin du projet, une méthode fiable et précise de mesure de l'efficacité alimentaire permettant par la suite de réfléchir aux moyens d'amélioration génétique de l'efficacité alimentaire. En effet, actuellement, il existe plusieurs méthodes de mesure de l'efficacité alimentaire

chez les poissons, mais il n'y a pas d'évaluation des corrélations entre ces méthodes. Il est donc nécessaire d'étudier les relations entre ces méthodes pour définir le meilleur moyen (efficacité/coût/temps d'analyses) de mesure.

Le projet comportera 4 étapes :

- Etape 1 : mesure de l'efficacité alimentaire individuelle de poissons élevés en groupes avec une alimentation optimale.
- Etape 2 : mesure de l'efficacité alimentaire individuelle de poissons élevés en groupes avec une alimentation restreinte à 50%.
- Etape 3 : mesure de l'efficacité alimentaire individuelle de poissons élevés en aquariums isolés avec une alimentation restreinte à 50%.
- Etape 4 : étude de l'évolution de l'efficacité alimentaire en fonction de l'âge des poissons avec une alimentation optimale.

L'ensemble des trois premières étapes sera réalisé sur un total de 200 poissons, permettant une estimation précise et fiable des corrélations phénotypiques entre les mesures réalisées.

Pour la 4ème et dernière étape, 20 poissons uniquement (parmi les 200 mesurés au cours des précédentes étapes) seront conservés et élevés en aquariums isolés pour suivre leur efficacité alimentaire au cours du temps, jusqu'à ce que les poissons atteignent un poids d'environ 100 g. Pour ce faire, les poissons seront nourris avec une ration optimale connue et leur croissance sera mesurée régulièrement (1 semaine par mois).

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). La mise au point d'une méthode fiable d'évaluation de l'efficacité alimentaire, objet du présent projet, pourrait permettre une sélection plus efficace en disposant d'un critère plus corrélé au caractère d'intérêt que les critères indirects actuels.

Dans l'objectif de trouver un critère fortement corrélé avec l'efficacité alimentaire des poissons, lors de l'étape 3, des mesures de cortisol excrété par les poissons seront réalisées. Le taux de cortisol des poissons représente le taux de stress, et il a été montré une corrélation forte entre l'efficacité alimentaire et le taux de cortisol plasmatique. Le choix de mesurer le taux de cortisol dans l'eau des aquariums d'élevage plutôt que dans le sang des poissons a été fait pour réduire le stress et la douleur des poissons (Raffinement). En effet, l'eau prélevée n'aura pas d'impact négatif sur les poissons, à l'inverse des mesures de cortisol plasmatique nécessitant un prélèvement sanguin.

Pour l'ensemble des étapes 3 et 4, les poissons seront élevés en aquariums isolés transparent permettant un contact visuel avec des congénères (Raffinement). Enfin, pour chaque biométrie et ou manipulation, les poissons seront anesthésiés afin d'éviter tout stress (Raffinement).

Ce protocole ne comporte pas de Remplacement, la mesure sur les poissons du caractère étant pour l'instant nécessaire.

10541 La Granulomatose Septique Chronique (CGD) est une maladie génétique orpheline (1/200 000 cas) de l'immunodéficience innée affectant les enfants en bas âge et diagnostiquée devant des infections sévères et récidivantes. Les phagocytes sont dépourvus d'activité NADPH oxydase, enzyme clé de la production de réactifs toxiques de l'oxygène (ROS) bactéricides. Il existe 5 formes génétiques de CGD, la plus fréquente est de transmission liée à l'X (CGDX, 70% des cas) et les autres de transmission autosomale récessive (CGDAR47 (25 % des cas), CGDAR22, CGDAR67 et CGDAR40). Une prophylaxie antibiotique et antifongique est généralement instaurée le plus précocement possible. La seule thérapie curative est la transplantation de moelle osseuse mais tous les patients ne peuvent en bénéficier, et la thérapie génique n'est pas encore envisageable. Il y a donc un manque réel de nouvelles thérapies pour cette maladie. Cependant pour développer de nouveaux traitements, il faut disposer de modèles animaux pertinents pour réaliser des essais précliniques. Or, il n'existe actuellement de modèles murins que pour 3 formes génétiques : CGDX, CGDAR47 et CGDAR22. Ces modèles animaux se sont révélés très utiles à la compréhension des mécanismes de la maladie ainsi qu'à l'évaluation de nouvelles thérapeutiques. Mais ils ont également des limites puisqu'ils ne modélisent pas parfaitement la physiologie humaine et ne peuvent donc pas toujours prédire les réactions du système immunitaire humain vis-à-vis d'un nouveau médicament.

Ainsi, les souris dites « humanisées » possédant un système hématopoïétique humain sont à l'heure actuelle le « must to have tool » pour les études précliniques et pour le screening de nouvelles molécules thérapeutiques. Elles peuvent être obtenues par transplantation de cellules souches/progéniteurs hématopoïétiques (CSPH) CD34+ (issues de sang de cordon, de tissus fœtaux ou du sang circulant après mobilisation par du G-CSF) dans des souris immunodéficientes. Cependant, pour créer des souris humanisées modélisant une pathologie hématologique/immunitaire donnée, la seule solution serait de prélever les CSPH CD34+ issues du sang des patients eux-mêmes. Or, la quantité de CSPH CD34+ circulante est trop faible et leur nombre est difficilement amplifiable. Une des alternatives actuelles serait d'utiliser des cellules CD34+ différenciées à partir de cellules souches pluripotentes induites (iPS) reprogrammées à partir de fibroblastes de patients atteints de CGD. Nos études précédentes in vitro ont permis d'identifier des cellules intéressantes pour une prise de greffe qui sont des cellules CD34+ issues d'iPS reprogrammés à partir de fibroblastes de patients ayant une CDGAR22 (phénotype proche des CSPH CD34+ humains). Notre objectif est donc de greffer ces cellules CD34+ issues d'iPS de patient CDGAR22 pour créer des souris humanisées modélisant la maladie.

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 des tests statistiques que nous utiliserons. De fait, un nombre total de 13 souris de type NSG (immunodéficientes) sera nécessaire. Ce projet nous permettra non seulement de disposer d'un modèle de souris humanisées CDGAR22 pour évaluer in vivo les nouvelles approches thérapeutiques que nous développons actuellement, mais cette technologie sera également applicable à la modélisation d'autres pathologies touchant le système hématopoïétique/immunitaire.

10542 Les acides gras polyinsaturés (AGPI) sont des constituants majeurs des membranes des neurones. Ce sont des lipides essentiels qui ne peuvent être fournis que par l'alimentation. Des altérations des taux d'AGPI ont été décrites dans plusieurs pathologies psychiatriques, en revanche, l'implication de ces altérations dans les symptômes reste à démontrer. Ces dernières années, nous avons pu montrer qu'une déficience en AGPI n-3 chez la souris durant le développement prénatal induit des déficits de motivation à l'âge adulte. Cette altération comportementale est directement liée à un dysfonctionnement d'un système cérébral central pour la motivation, le « système mésolimbique ». Le but de ce projet est de déterminer quelles sont les populations de neurones au sein de ce système de neurotransmission qui sont impliquées dans ces déficits comportementaux observés. Pour cela, nous utiliserons une approche transgénique qui permettra de manipuler les taux d'AGPI uniquement dans certaines populations neuronales.

Afin de tester la motivation, les souris adultes seront soumises à des tests comportementaux de conditionnement opérant.

Nous prévoyons d'utiliser 576 souris C57BL/6J (288 mâles et 288 femelles), ce projet s'étendant sur une durée de 3 ans et nécessitant l'utilisation de 4 génotypes pour chaque croisement.

L'ensemble des procédures proposées est en conformité avec les directives européennes 2010/63/UE et françaises, dans le respect des nouveaux standards de soin et de bien-être des animaux (règle des 3Rs), appliqués dans notre équipe de recherche : régulation de la température, de l'hygrométrie, raffinement de l'enrichissement des cages pour améliorer leur hébergement. Ce projet ne peut être réalisé sans l'utilisation de modèles animaux puisqu'il s'intéresse à des dimensions comportementales, non modélisables sur des modèles in vitro ou in silico. Les recherches seront réalisées en accord avec les recommandations institutionnelles pour le bon traitement des animaux de laboratoire. Tous les efforts seront faits pour réduire le nombre et la souffrance des animaux utilisés afin d'éviter les répétitions inutiles.

10543 La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est une maladie incurable qui conduit à une paralysie par disparition des neurones commandant les muscles. La plupart des études se sont focalisées sur les

périodes symptomatiques ou pré-symptomatiques et non pas sur les mécanismes initiaux conduisant fort probablement à la survenue de la maladie. Dans le présent projet, nous souhaitons étudier la SLA bien avant qu'elle ne s'exprime au niveau des réseaux moteurs de la moelle épinière de souris. Nous pensons mettre en évidence des anomalies lors du développement de ces réseaux chez la souris *Fus Δ NLS* qui développe les symptômes de la SLA humaine. Un développement anormal du réseau moteur pourrait ainsi avoir des conséquences tardives conduisant à la dégénérescence des motoneurons pendant la vie adulte et à la paralysie fatale chez les patients SLA. Notre projet repose sur des expériences réalisées *in vitro* (analyse des inhibitions au niveau des motoneurons lombaires) qui nécessitent une validation *in vivo* dans un organisme entier (suivi du poids, tests de motricité), le remplacement intégral des animaux par des expériences *in vitro* étant impossible. Durant ce projet nous réaliserons un traitement pharmacologique de souris gestantes (bumétanide ou CLP-290) afin de potentialiser *in utero* le niveau des inhibitions des motoneurons des fœtus. Nous regarderons ensuite les effets de ce traitement prénatal sur le devenir des animaux adultes. Le traitement des souris au CLP-290 n'est pas décrit dans la littérature comme dommageable pour les animaux. Nous vérifierons les éventuels dommages causés à la femelle gestante et/ou aux animaux en gestation et mettrons en balance ces dommages (peu probables) avec les bénéfices attendus. Le nombre d'animaux requis sera limité au maximum en veillant tout de même à pouvoir réaliser des tests statistiques en fin d'expérience sur un échantillonnage correct. Au total 1896 souris seront nécessaires pour un projet de 5 années. Des mesures seront prises pour soulager la souffrance animal (mise en place de soins, interruption ou report de la procédure, euthanasie de l'animal) si les points limites sont atteints. Les conditions d'hébergement seront continuellement raffinées en veillant au bien-être animal au quotidien, par le biais d'enrichissement (tunnels polycarbonate) et de suivi attentif par du personnel compétent et qualifié, weekend compris. Les conseils d'un vétérinaire ou de la Structure du Bien Etre Animal (SBEA) seront toujours écoutés et le plan expérimental sera également raffiné en utilisant au mieux les animaux, en ne réalisant pas d'expériences superflues et en veillant à ce que les traitements proposés soient non-toxiques et renseignés. Dans son ensemble, notre projet basé sur le respect de la règle des 3R, constituera un premier pas vers de nouvelles stratégies de recherche qui seront essentielles pour diagnostiquer la SLA à des stades précoces.

10544 L'objectif global de ce projet est de discriminer les effets des antagonistes des récepteurs des NMDA (un dérivé d'acide aminé) sur la masse tumorale et la vascularisation dans un modèle de carcinome rénal *in vivo*, ouvrant ainsi une application innovante dans le traitement du cancer. Une revue récente indique que ces récepteurs pourraient être pertinents dans le traitement du cancer. Si toute l'attention de la communauté médicale est actuellement tournée sur les inhibiteurs de point de contrôle du système immunitaire comme nouveaux outils thérapeutiques des cancers, les résultats indiquent que tous cancers confondus, seulement 20 à 30% des cas répondent à ces traitements, au prix d'effets secondaires importants, comme des manifestations auto-immunes en cours de traitement, qu'il faut alors traiter par des immunosuppresseurs. Les antagonistes du VEGFR tels que Sunitinib et Bevacizumab donnent des résultats variables sur la survie, avec une certaine toxicité. Il y a donc la place pour une molécule innovante qui ciblerait à la fois la prolifération et l'angiogenèse tumorale, sans atteindre le VEGFR pour tenter de contourner la résistance et les effets secondaires actuels, utilisable seule ou en traitement combiné à l'immunothérapie du cancer selon les indications. Ce nouveau concept de « molécule duale » dans le traitement du cancer pourrait être attractif pour l'industrie pharmaceutique. Des premières études ont été menées *in vitro* permettant de confirmer l'intérêt de ce type de molécule. Certaines cellules cancéreuses détournent le NMDAR pour leur prolifération aberrante. Dans des modèles animaux de cancer, des antagonistes spécifiques des récepteurs des NMDA inhibent la prolifération des cellules cancéreuses et empêchent la croissance tumorale, augmentant considérablement la survie des animaux. Par ailleurs, il a été montré que les antagonistes des récepteurs NMDA ont des effets anti-angiogéniques *in vitro* en plus des effets antiprolifératifs identifiés via la signalisation du VEGFR dans les cellules endothéliales. Cependant il reste à démontrer *in vivo* l'effet anti-angiogénique de ces nouvelles molécules.

C'est dans ce contexte que des expérimentations in vivo sur souris par échographie de contraste (DCE-US) sont prévues. Cette technique est largement exploitée en clinique humaine dans les essais de Phase I/II. La valeur ajoutée de cette approche est que les examens par DCE-US permettent de suivre en parallèle la masse tumorale associée à la prolifération des cellules tumorales et l'arbre microvasculaire tumoral reflétant l'angiogenèse tumorale.

Cette étude sera menée sur 180 souris permettant de valider 1) la cinétique d'action des molécules et 2) l'efficacité thérapeutique et le bénéfice par rapport aux thérapies existantes. Le respect de la règle des 3R a été une préoccupation constante dans la préparation du protocole de notre étude.

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 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 observées 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. Ce nombre est nécessaire afin d'assurer la pertinence des résultats et le bénéfice éventuel. 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.

Raffinement : nous adapterons la procédure en tenant compte des points limites à ne pas dépasser, en particulier le volume tumoral et la perte de poids de l'animal qui seront suivis quotidiennement. 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.

10545 Les gliomes sont des tumeurs cérébrales de très mauvais pronostic. Du fait de leur caractère infiltrant, ces tumeurs récidivent après exérèse chirurgicale au niveau des berges d'exérèse. Dans ce cas, la densité de cellules cancéreuses résiduelles détermine en partie l'endroit de récurrence, mais l'explication est incomplète. Un autre facteur déterminant est le remaniement du microenvironnement induit par l'acte chirurgical lui-même. L'inflammation et la cicatrice gliale consécutives à l'exérèse agiraient comme des agents promoteurs de tumeur favorisant la récurrence tumorale au niveau des berges d'exérèse. Contrôler la réaction inflammatoire et la cicatrice gliale post chirurgicales est donc un domaine de recherche qui pourrait modifier le caractère actuellement inévitable de ces récurrences tumorales. La caractérisation histologique, protéomique et transcriptomique des berges d'exérèse nous permettra de déterminer les facteurs pro-tumorigènes induits par la lésion et de caractériser un modèle de repousse de gliome.

L'utilisation dans ce projet de 137 rats issus de la souche fisher 344 doit permettre d'atteindre une puissance statistique suffisante pour conclure. Aucun modèle alternatif ne permet à ce jour de mimer la réaction du tissu à la lésion chirurgicale. La mutualisation des groupes contrôles permet de limiter le nombre d'animaux tout en gardant une marge suffisante pour garantir un résultat significatif en dépit des aléas expérimentaux. Le recul important du laboratoire sur les modèles de tumeur chez le rat permet une prise en charge efficace de la douleur par le choix de points limites adaptés afin d'éviter toute souffrance animale.

10546 Les plaquettes sanguines jouent un rôle clef en hémostase. Leur accumulation au niveau d'une lésion vasculaire forme un clou hémostatique qui stoppe l'hémorragie. Un processus similaire peut survenir dans un vaisseau malade et mener à l'occlusion du vaisseau, responsable de maladies ischémiques graves comme l'accident vasculaire cérébral ou l'infarctus du myocarde, qui représentent la première cause de mortalité dans le monde.

Nous avons identifié une cible antithrombotique particulièrement intéressante qui pourrait prévenir les accidents thrombotiques sans faire saigner. Nous avons démontré in vitro, qu'un agent qui bloque cette cible entraîne la désagrégation d'un agrégat des plaquettes humaines, mais pas un

agrégat de plaquettes de souris. Apporter une preuve in vivo de cet effet serait un atout majeur pour justifier son utilisation en phase clinique chez l'homme.

L'objectif de cette étude est de démontrer chez la souris que notre agent bloquant entraîne la désagrégation d'un agrégat des plaquettes humaines qui seront transfusées dans une souris thrombopénique.

Réduction

Les modèles de thrombose in vivo utilisés dans cette étude sont bien maîtrisés au laboratoire, déjà décrits et publiés. Ceci permet d'éviter toute mise au point utilisant des animaux supplémentaires. De plus, le nombre d'animaux utilisés dans chaque groupe sera le plus petit possible, soit 10, afin d'obtenir des résultats statistiquement significatifs. Ces choix permettent de réduire considérablement le nombre d'animaux nécessaires.

Raffinement

Un soin particulier sera apporté afin de diminuer le stress et la douleur de tous les animaux utilisés dans ce projet :

- 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
- 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 chaque procédure.

Pendant toutes les expérimentations, les animaux sont surveillés par du personnel entraîné.

Remplacement

Une première partie de l'étude a été réalisé avec du sang humain puis de souris en utilisant un modèle de perfusion ex vivo, disponible au laboratoire. Il s'agit d'un système en flux composé de chambres microfluidiques de petite taille couplées à un système de microscopie. Nous avons observé que l'agent anti-GPVI désagrège des agrégats de plaquettes humaines mais est sans effet sur des plaquettes de souris exprimant la GPVI humaine. L'utilisation de ce système s'avère toutefois insuffisant, car le système d'aspiration ne reproduit pas la complexité de l'écoulement sanguin et se fait avec du sang anticoagulé qui n'a pas les mêmes propriétés que le sang circulant. Ainsi, des expériences complémentaires nécessitant des données in vivo seront nécessaires.

Un minimum de 80 souris et un maximum de 240 souris seront nécessaire pour mener à bien ce projet.

10547 Le microbiote intestinal représente l'ensemble des micro-organismes présents dans le tube digestif. Ce microbiote interagit avec le système immunitaire de l'hôte et est impliqué dans son bon fonctionnement. La prescription d'antibiotique modifie la composition du microbiote intestinal favorisant entre autres l'implantation de bactéries hautement résistantes aux antibiotiques. De même, la perturbation du microbiote est décrite pour altérer une réponse immunitaire adéquate chez l'hôte. Ainsi, un traitement antibiotique, au-delà de favoriser l'implantation de bactéries hautement résistantes aux antibiotiques, pourrait également altérer la réponse immunitaire de l'hôte à l'origine d'une susceptibilité accrue de l'hôte à de nouvelles infections.

Le but de ce projet est d'étudier l'effet d'une perturbation du microbiote intestinal induite par des antibiotiques et l'effet de l'implantation stable de bactéries hautement résistantes aux antibiotiques sur la qualité de leur réponse immunitaire lors d'une infection pulmonaire par *Pseudomonas aeruginosa*. Ainsi, des altérations de microbiote de souris traitées par antibiotiques et colonisées ou non à bactéries hautement résistantes aux antibiotiques seront étudiées dans des conditions d'infections respiratoires à *P. aeruginosa*.

L'objectif du projet est de décrire des nouveaux concepts dans l'interaction de l'hôte avec son environnement comme les antibiotiques et les bactéries multi-résistantes et de nouvelles options thérapeutiques. Cette étape de validation de concept est nécessaire avant translation vers des études en clinique humaine. Dans le cadre de ce projet, il n'est pas possible de remplacer le modèle animal par des lignées cellulaires. Afin de réduire au maximum le nombre de souris nécessaire au projet, nous avons mis en place un processus de validation des meilleures conditions

expérimentales lors de phases test établissant la meilleure posologie des antibiotiques à utiliser, ou les différents temps opératoires pour évaluer nos effets. Une surveillance clinique quotidienne est réalisée afin d'identifier les potentiels signes de douleur engendrée par le protocole durant toute la durée de l'étude. En cas de besoin, un traitement antalgique sera instauré adapté au type de procédure invasive. Cette approche nous permet de respecter les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement des animaux. Ce projet nécessite 1200 souris de fond génétique C57/BL6.

10548 Les acides gras polyinsaturés (AGPI) sont des lipides essentiels qui ne peuvent être fournis que par l'alimentation. Ces dernières années, nous avons pu montrer qu'une déficience en AGPI n-3 chez la souris durant le développement périnatal induit des modifications de l'architecture neuronale accompagnées de déficits de la mémoire. Ces altérations ont été liées à une augmentation de l'inflammation microgliale et plus particulièrement de la phagocytose. Le but de ce projet est de discriminer la part jouée par les cellules microgliales ou les neurones dans ces processus inflammatoires.

Pour cela, nous utiliserons une approche transgénique qui permettra de manipuler les taux d'AGPI uniquement dans certaines populations cellulaires. Pour ce projet nous devons valider l'efficacité du modèle transgénique à générer un enrichissement en AGPI uniquement dans la population cellulaire cible et en observer les effets moléculaires et neuro-anatomiques. Ce projet aura également pour but de mesurer les effets cognitifs de la manipulation des AGPI dans les différents types cellulaires (microglies versus neurones). Afin de tester la mémoire, les souris seront soumises à des tests comportementaux (labyrinthe en Y).

Nous prévoyons d'utiliser 1468 souris, ce projet s'étendant sur une durée de 3 ans et nécessitant l'utilisation de 4 génotypes pour chaque croisement.

Traditionnellement les travaux de recherche sont effectués sur des individus mâles pour s'affranchir des cycles hormonaux et ainsi obtenir une moindre variabilité des résultats. Cependant de plus en plus de données (chez l'animal et l'humain) montrent que les résultats obtenus chez les mâles et notamment en ce qui concerne le métabolisme des lipides, ne sont pas nécessairement applicables aux femelles. Y compris à des stades précoces du développement durant lesquelles les femelles ne montrent pas encore de cycles hormonaux. C'est pourquoi nous souhaitons également inclure les femelles à notre étude. Cela nous permettra d'obtenir des résultats tenant compte des différences de métabolisme entre les sexes.

Ce travail est clef pour la compréhension du développement du cerveau et plus particulièrement dans un contexte de carence en oméga3 que représente le régime alimentaire occidental.

L'ensemble des procédures proposées est en conformité avec les directives européennes 2010/63/UE et françaises, dans le respect des nouveaux standards de soin et de bien-être des animaux (règle des 3Rs), appliqués dans notre équipe de recherche : régulation de la température, de l'hygrométrie, raffinement de l'enrichissement des cages pour améliorer leur hébergement. Nous avons, quand il était possible, remplacé les animaux vivants par des modèles in vitro. Les étapes finales ne peuvent s'affranchir de l'organisme dans son intégralité. Les recherches seront réalisées en accord avec les recommandations institutionnelles pour le bon traitement des animaux de laboratoire. Tous les efforts seront faits pour réduire le nombre et la souffrance des animaux utilisés. Pour toutes les procédures expérimentales, nous avons calculé le nombre minimal de souris requis afin d'aboutir à des données analysables par méthodes statistiques classiques. Nous prenons en compte le bien-être des animaux via l'enrichissement des cages, la stabulation en cages collectives, la prise en charge de la douleur si nécessaire et l'euthanasie des animaux si les points limites sont atteints (voir annexe « Points limites »).

10549 Les gliomes sont des tumeurs cérébrales de très mauvais pronostic. Du fait de leur caractère infiltrant, ces tumeurs récidivent après exérèse chirurgicale au niveau des berges d'exérèse. Un facteur déterminant est le remaniement du microenvironnement induit par l'acte chirurgical lui-même. L'inflammation et la réaction gliale consécutives à l'exérèse agiraient comme des agents promoteurs de tumeur favorisant la récurrence tumorale au niveau des berges d'exérèse. Contrôler la réaction inflammatoire et la réaction gliale post chirurgicales est donc un domaine de recherche qui

pourrait modifier le caractère actuellement inévitable de ces récurrences tumorales. Les modèles actuels se concentrent sur l'implantation de cellules cancéreuses pour induire une tumeur. Ces modèles de tumeur primaire ne correspondent pas au problème posé par la récurrence post-thérapeutique qui est en fait le véritable défi thérapeutique.

Par ailleurs la question de l'influence de cellules tumorales à distance du site chirurgical dans le phénomène de récurrence est peu étudiée. Un nouveau modèle doit être mis en place pour étudier le lien entre l'inflammation de la résection chirurgicale et le développement d'une tumeur distante. La caractérisation histologique, protéomique et transcriptomique des berges d'exérèse et de la tumeur contra latérale nous permettra de mettre en évidence et de déterminer les éventuels facteurs pro-tumorigènes induits par la lésion. Le suivi par fluorescence des cellules tumorales nous permettra de vérifier s'il y a une influence réciproque ou non entre la tumeur en développement et la récurrence tumorale dans la berge de résection.

L'utilisation dans ce projet de 50 rats issus de la souche fisher 344 doit permettre d'atteindre une puissance statistique suffisante pour conclure. Aucun modèle alternatif ne permet à ce jour de mimer la réaction du tissu à la lésion chirurgicale en présence d'une autre tumeur en développement. Le recul important du laboratoire sur les modèles de tumeur chez le rat permet une prise en charge efficace de la douleur par le choix de points limites adaptés afin d'éviter toute souffrance animale par la supplémentation en analgésiques adaptés, ou l'euthanasie. Des enrichissements seront disposés dans les cages, et les animaux seront habitués quotidiennement à la préhension 7 jours avant une procédure.

10550 Les cancers colorectaux (CCR) représentent la deuxième cause de mortalité par cancer actuellement en France. La survie à long terme est largement impactée par la présence de métastases à distance. Les sites métastatiques les plus fréquents sont le foie, les poumons et le péritoine, une membrane séreuse tapissant la cavité abdominale. Les métastases péritonéales, connues sous le nom de carcinose péritonéale (CP) sont associées à une survie à long terme plus sombre par rapport aux autres sites métastatiques.

La propagation des cellules tumorales du site de la tumeur primitive (colon ou rectum), connue comme « dissémination métastatique », représente la première étape de la formation des métastases et devient, à ce titre, une cible thérapeutique stratégique.

Dans des études antérieures, nous avons identifié au niveau du liquide péritonéal de patients atteints de CP d'origine colorectale des cellules tumorales organisées sous forme classique de cellules indépendantes ou isolées (CI) et sous forme de larges sphères tumorales (ST) constituées d'une centaine de cellules tumorales cohésives. Cette entité prédominante dans certains types de tumeurs est largement dominante au niveau péritonéal et très peu étudiée dans la littérature.

Le but de ce projet est donc de :

- déterminer la capacité métastatique des ST (particulièrement au niveau du foie)
- développer un modèle animal de CCR orthotopique à partir de ST.

La 1ère phase consistera à injecter en intrasplénique des cellules tumorales dans leurs différentes formes (ST et CI) afin d'étudier et de comparer leur potentiel métastatique.

En raison de son drainage via la circulation sanguine digestive, la rate est un organe de choix pour l'étude du passage des cellules cancéreuses dans le sang jusqu'au niveau du foie, premier filtre sanguin de l'ensemble du système digestif.

Une fois le potentiel métastatique des ST confirmé, nous pourrions mettre en place notre modèle orthotopique dans le but de reproduire le CCR au niveau de son site initial à travers l'injection intra rectal des ST, pour ensuite déclencher le processus de dissémination métastatique le plus près de son contexte biologique.

Cette étude requiert donc l'utilisation des souris immunodéprimées pour mettre en évidence le potentiel métastatique des ST et créer un nouveau modèle orthotopique avec un mécanisme de dissémination métastatique le plus pertinent en rapport au modèle humain. La biologie des CRC, en particulier le processus de dissémination locale ou à distance, est un domaine de recherche qui permet d'étudier les différents axes de recherche au niveau moléculaire, cellulaire et clinique.

Le développement de ces méthodes s'inscrit pleinement dans la mise en place de méthodes alternatives à l'utilisation d'animaux, puisqu'une grande partie des expériences seront faites sur des

explants ex vivo (organoïdes) et par des tests d'invasion in vitro (gel 3D collagène), ce qui permet, entre autres, d'utiliser moins d'animaux, pour effectuer des panels de tests et de caractérisation très importants (réduction et remplacement). Le bien-être des souris sera respecté en limitant la souffrance par le respect des méthodes anesthésiques et analgésiques ; l'hébergement comprendra un enrichissement sous forme de cocoons (raffinement). Une planification statistique a permis de réduire le nombre d'animaux utilisés tout en préservant la validité statistique de l'étude (réduction). Le nombre total de souris pour ce projet est de 81 souris sur 18 mois.

10551 Il existe plusieurs formes d'apprentissages sous-tendus par des réseaux cérébraux différents. De façon schématique, on oppose généralement l'apprentissage déclaratif (construire une représentation mentale de mon environnement par exemple) associé à des structures cérébrales appelées cortex limbique et hippocampe et l'apprentissage procédural (apprendre à faire de la bicyclette) associé au cortex préfrontal et aux ganglions de la base. La dopamine (DA) est généralement associée à l'apprentissage par renforcement (apprentissage automatique, dont le but est d'apprendre, à partir d'expériences, ce qu'il convient de faire en différentes situations, de façon à optimiser une récompense quantitative au cours du temps). Ses mécanismes d'actions sont très étudiés dans les structures sous corticales associées à la maladie de Parkinson (ganglions de la base). Cependant, il a aussi été démontré que la dopamine jouait un rôle dans les mécanismes physiologiques qui contrôlent la formation de la représentation mentale de l'environnement dans l'hippocampe. Jusqu'à présent, l'origine de la dopamine libérée dans l'hippocampe et son rôle exact dans la mémoire spatiale est mal connu. Nous avons récemment montré que le blocage des récepteurs dopaminergiques dans l'hippocampe perturbe l'apprentissage spatial chez les rongeurs. Cette perturbation est accompagnée d'une modification de l'activité neuronale dans cette structure. Il reste maintenant à déterminer l'origine de la dopamine dans l'hippocampe. L'innervation dopaminergique de cette structure est très clairsemée et mal caractérisée malgré une recherche intensive ces dernières années. A ce jour, il existe deux hypothèses concernant l'origine de la dopamine dans l'hippocampe. Selon la première, elle pourrait provenir de l'aire tegmentale ventrale (VTA) qui est une structure dopaminergique associée à l'apprentissage par renforcement. La seconde hypothèse propose que la dopamine est co-libérée par les fibres noradrénergiques du locus coeruleus (LC) qui est impliqué dans la perception de la nouveauté. Notre objectif, dans ce projet, est de déterminer laquelle de ces deux hypothèses est la bonne. Nous utiliserons un nouvel outil chimio-génétique (DREADDs) qui associe pharmacologie et génie génétique afin d'inhiber de façon sélective les neurones du LC ou de la VTA. Le modèle rongeur est le modèle de référence pour l'étude de la mémoire spatiale. Réduction : Cette étude porte sur 40 rats mâles, ce chiffre a été choisi pour satisfaire aux exigences de rigueur statistiques minimum. Il est indispensable de travailler avec des mâles pour ne pas être parasité par les modifications comportementales dues au cycle oestrogénique. Remplacement : L'utilisation d'animaux est indispensable pour l'étude de la mémoire spatiale, il est donc impossible de substituer l'animal vivant par un modèle in vitro. Raffinement : les animaux sont hébergés à plusieurs dans un milieu enrichi afin d'améliorer leur condition de vie et de limiter leur stress. Nous utiliserons des produits d'anesthésie et des antalgiques pendant et la chirurgie et la convalescence.

10552 L'objectif de cette étude est d'observer les différences comportementales et physiologiques chez le modèle porcin (porcs conventionnels en croissance) soumis à un stress psychosocial chronique et exposé ou non à un additif alimentaire, en étudiant ses effets au niveau du microbiote et des comportements.

Deux groupes expérimentaux de 22 animaux seront constitués, menant à un total de 44 animaux (mâles et femelles). Ces animaux seront soumis à un stress psychosocial qui a été validé dans une précédente étude, faisant 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 les deux groupes les animaux recevront chaque jour, en plus de l'aliment de croissance standard, un additif que l'on souhaite étudier (à base d'extraits végétaux) ou un placebo, distribués dans du fromage blanc. Après 4 semaines, la réactivité des animaux sera évaluée lors d'un test comportemental de contention.

Des prélèvements de salive seront réalisés à 6 reprises afin d'étudier les taux de cortisol sur la période expérimentale. Des échantillons de fèces seront également prélevés à 6 reprises afin d'étudier les variations du microbiote intestinal et son activité fermentaire.

10 animaux par groupe seront soumis à une session d'imagerie cérébrale par IRMf (Imagerie par Résonance Magnétique fonctionnelle) permettant de cartographier les zones cérébrales modulées par la perception d'un additif alimentaire, en présence ou non d'un stimulus stressant. 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.

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 (additif alimentaire), il est impératif d'utiliser des animaux vivants et vigiles pour explorer leur comportement et les réponses physiologiques. REDUIRE : 12 animaux par groupe pour les données physiologiques et comportementales, et 10 animaux par groupe pour l'imagerie cérébrale représentent un effectif minimum et raisonnable pour obtenir des différences significatives entre les groupes expérimentaux. 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.

10553 L'utilisation de souris transgéniques représente un atout majeur pour l'étude des circuits et substrats cellulaires des comportements. Notre recherche s'intéresse aux bases neurobiologiques du système cannabinoïde, avec une emphase particulière pour le rôle du récepteur CB1, et le recours aux modèles transgéniques existant nous permet d'analyser le rôle des différentes localisations du récepteur, dans la membrane plasmique ou dans la mitochondrie.

Le présent projet a pour but de générer 11 nouvelles lignées transgéniques où on notera au niveau de la mitochondrie l'absence du récepteur CB1 dans différentes catégories cellulaires. Nous proposons d'évaluer, si le phénotype de ces nouvelles lignées est dommageable ou non en réalisant un suivi de développement de la naissance jusqu'à l'âge adulte.

La règle des 3R sera respectée en ce qui concerne la Réduction en suivant les recommandations du réseau ROCAD (Réseau Opérationnel de Centres pour faciliter l'Accès et la Distribution des modèles souris) pour l'évaluation de la sévérité des phénotypes des lignées de souris génétiquement modifiées, et en effectuant une évaluation comportementale sur un échantillon représentatif de 14 souris par lignée. Afin de Raffiner nos expériences, un soin particulier sera apporté à la qualité des conditions d'hébergement, les animaux seront hébergés dans les cages collectives avec un milieu enrichi (matériel de nidation). De plus, dans le cadre du suivi de la santé des animaux (blessures, signes cliniques d'affections), des points limites seront définis et appliqués. Enfin aucun Remplacement ne pourra être envisagé puisque cette saisine a pour objectif d'évaluer le phénotype des animaux générés (le nombre des animaux sera de 154).

10554 La myéline est une substance qui gaine la plupart des fibres nerveuses. Elle agit comme un isolant électrique qui augmente l'efficacité de la conduction de l'influx nerveux. Le processus de myélinisation est indispensable au développement et au fonctionnement du système nerveux central qui intègre les fonctions sensorielles, motrices et cognitives. Les altérations de la gaine de myéline conduisent à des déficits fonctionnels sévères. Ainsi, la sclérose en plaques (SEP), qui atteint 60 000 personnes en France et représente actuellement la deuxième cause de handicap chez les jeunes adultes, est une maladie neurologique caractérisée par une démyélinisation progressive des fibres nerveuses du cerveau et de la moelle épinière. Des lésions inflammatoires disséminées se forment et entraînent une détérioration de la myéline et en conséquence un ralentissement voire un blocage de la transmission de l'influx nerveux. L'étiologie de la SEP n'est pas entièrement élucidée et on admet actuellement qu'elle est multifactorielle. Elle reste pour l'instant incurable. Même s'il existe une diminution significative de la fréquence, de la durée et de l'intensité de rechutes chez les patients traités par immunosuppresseurs et immunomodulateurs, à

long terme, ces traitements sont inefficaces. Les lésions deviennent chroniques et l'atteinte des fibres nerveuses génère des handicaps irréversibles. La réparation des gaines de myéline détruites encore appelée remyélinisation est actuellement considérée comme un objectif clinique majeur, parce qu'elle pourrait sans doute contribuer au ralentissement ou même à la prévention de la maladie. Une des zones cérébrales fortement touchée chez les patients atteints de SEP est le corps calleux, qui comprend les fibres nerveuses qui connectent les deux hémisphères. Le corps calleux présente une perte de myéline et donc une atrophie importante chez les patients atteints de SEP. Dans ce projet, nous nous proposons de tester l'effet de deux composés, développés par une société pharmaceutique, sur la démyélinisation observée au niveau du corps calleux dans un modèle murin mimant les effets de la SEP, par des enregistrements électrophysiologiques sur coupes cérébrales. Ce modèle consiste à administrer une diète à la Cuprizone, induisant des lésions préférentielles dans le corps calleux, pendant une durée maximale de 8 semaines. Les fonctions motrices des souris seront testées à l'aide de tests comportementaux. A la fin de l'étude comportementale, les animaux seront euthanasiés afin de réaliser des coupes cérébrales et les composés à tester seront appliqués directement sur ces coupes. Nous utiliserons pour cette étude 56 souris à l'âge adulte.

Ce projet se justifie pleinement d'un point de vue scientifique et sera réalisé dans le respect éthique de la règle des 3R (remplacement, réduction et raffinement) :

-remplacement : l'étude du système nerveux, de par sa complexité d'organisation, de développement et de fonctionnement, ne saurait être envisagée hors du contexte intégré retrouvé au sein de l'organisme entier. En ce sens, seules des approches menées chez un modèle animal, certes simplifié, peuvent améliorer la connaissance du cerveau humain et son développement, et ainsi aboutir au traitement de cette pathologie et au développement de nouvelles thérapies. Nos expérimentations seront réalisées chez la souris, car il existe un modèle animal de la SEP utilisé communément par la communauté scientifique nationale et internationale pour la recherche fondamentale et l'étude de l'effet de composés. Ces rongeurs, de petite taille et d'élevage facile, possèdent un système nerveux dont le développement est extrêmement proche de celui du système nerveux humain, et dont l'organisation, certes simplifiée, est suffisamment complexe.

-réduction : le nombre de souris a été réduit autant que possible, tout en étant suffisant pour l'obtention de résultats exploitables. L'évaluation du nombre d'animaux nécessaire a été effectuée par l'utilisation du programme GPower 3.1. Les résultats seront analysés avec le logiciel GraphPad Prism. Nous adapterons les tests statistiques en fonction de la distribution des observables, qu'elle soit normale ou non.

-raffinement : les animaux seront hébergés dans des cages avec portoirs ventilés. Boisson et nourriture seront disponibles ad libitum. Avant les expériences, les animaux seront acclimatés pendant une période d'une semaine. Au cours de cette période d'acclimatation, les animaux seront manipulés, afin de les habituer à l'expérimentateur. Dès que l'administration de la cuprizone débutera, les animaux seront pesés quotidiennement afin de suivre l'évolution de leur poids. Le bien-être des animaux sera attentivement suivi quotidiennement par l'établissement de fiches d'évaluations, permettant ainsi de détecter toute souffrance, angoisse ou signes de stress pour les animaux. Ces fiches permettront par ailleurs de déterminer des points limites précoces et adaptés. En cas de souffrance de l'animal, la surveillance sera rapprochée et les animaux seront soignés en fonction de la sévérité de la douleur observée. Si les signes de souffrance persistent, les animaux seront euthanasiés.